

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Análise Genotípica e Fenotípica de Isolados Clínicos de
Mycobacterium avium - *intracellulare***

Ricardo Filipe Gaspar Taveira

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Isabel Portugal
Professora Doutora Mónica V. Cunha



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa sob a orientação direta dos Professores Doutores Isabel Portugal e João Perdigão.

A Professora Doutora Mónica Cunha foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Isabel Portugal, minha orientadora externa na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, e à Professora Doutora Mónica V. Cunha, minha orientadora interna na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Quero também agradecer ao Professor Doutor João Perdigão, meu coorientador na faculdade de farmácia da Universidade de Lisboa. Estou muito grato por todo o apoio e conhecimento que me foi dado ao longo da dissertação. A boa relação com todos os envolvidos foi fundamental no desenvolvimento deste projeto.

Em segundo lugar, quero agradecer a todos os professores e colaboradores que me acompanharam ao longo de toda a licenciatura e do primeiro ano do mestrado. Todo o conhecimento adquirido ao longo destes quatro anos mostrou-se fundamental e extremamente útil na realização desta dissertação.

Por fim, quero agradecer a todos os familiares e amigos, aos meus pais, ao meu irmão e à minha namorada por me terem apoiado e suportado ao longo da minha formação académica.

Artigos publicados:

Pereira, C., Gomes, P., Taveira, R., Silva, C., Maltez, F., Macedo, R., Costa, C., Couvin, D., Rastogi, N., Viveiros, M., Perdigão, J., Portugal, I. (2019). Insights on the *Mycobacterium tuberculosis* population structure associated with migrants from Portuguese-speaking countries over a three-year period in Greater Lisbon, Portugal: Implications at the public health level. *Infection, Genetics and Evolution*, 71, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.025>

Resumo

Nos últimos anos tem se verificado um aumento do número de casos de doença devido a infeção por micobactérias não-tuberculosas (MNT). Enquanto microrganismos patogénicos oportunistas apresentam uma grande variedade de hospedeiros, podendo infetar seres humanos e outros animais, sendo a sua presença ubíqua em diversas fontes ambientais como o solo, a água, entre outros. No caso do Homem, os indivíduos imunocomprometidos são os mais suscetíveis a infeções por MNT não havendo evidências de transmissão entre indivíduos. Do ponto de vista clínico, estas infeções manifestam-se sobretudo na forma de infeção respiratória podendo também ocorrer infeção em outros órgãos e, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, ocorrer infeção disseminada.

O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) é o principal complexo de micobactérias não-tuberculosas, sendo *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* as principais espécies deste complexo. A espécie *M. avium* é ainda dividida nas subespécies *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. A comparação e diferenciação de isolados clínicos de *M. avium* e de *M. intracellulare* nem sempre é fácil quer devido à sua proximidade filogenética, quer devido à baixa taxa de crescimento dos isolados destas espécies. Assim, para este fim, recorre-se frequentemente a alguns métodos genéticos, baseados sobretudo na técnica do PCR, e a algumas técnicas fenotípicas das quais se destacam os testes de suscetibilidade a diversos antibióticos.

No presente trabalho procurou-se caracterizar a estrutura populacional e os níveis de resistência de um conjunto de isolados clínicos de microrganismos pertencentes ao MAC em Portugal, nomeadamente *M. avium* e *M. intracellulare*. Para esse finalidade, começou-se por realizar a identificação de 24 isolados clínicos de *M. intracellulare* e identificar, ao nível da subespécie, os 22 isolados clínicos de *M. avium* obtidos de diversos laboratórios e hospitais na região de Lisboa. Procurou-se inicialmente identificar cada um destes isolados através da amplificação de vários *loci* dentro dos quais se destacam as sequências de inserção IS900, IS901, IS1245 e IS1311. Foram obtidos cinco perfis de amplificação incompatíveis com as espécies aqui estudadas sendo que, cinco isolados clínicos de *M. intracellulare* e dois isolados clínicos de *M. avium* não puderam ser identificados com recurso a este método, havendo a suspeita que entre os isolados clínicos de *M. intracellulare* poderia haver isolados pertencentes à espécie *M. chimaera*, uma vez que esta espécie aparece, devido às limitações do teste GenoType, frequentemente mal identificada como *M. intracellulare*.

Assim, com o objetivo de discriminar entre *M. intracellulare* e *M. chimaera* em isolados inicialmente identificados como *M. intracellulare* por recurso ao teste GenoType, procurou-se de seguida discriminar e avaliar a prevalência de *M. chimaera* na amostra estudada através da amplificação do gene SR1 (específico de *M. chimaera*). Verificou-se amplificação deste gene em nove dos 24 isolados inicialmente identificados como *M. intracellulare*, sugerindo assim que estes isolados devem pertencer na verdade à espécie *M. chimaera*. Contudo, nenhum destes nove isolados correspondeu aos cinco isolados com os perfis de amplificação das sequências de inserção incompatíveis com a espécie pelo que, seguidamente, se procedeu à amplificação, purificação e sequenciação do *locus* ITS e do gene *hsp65* (este apenas para um grupo menor de isolados). Neste teste foram incluídos todos os 24 isolados de *M. intracellulare*, três isolados de *M. avium* e as estirpes de referência *M. avium* ATCC25291 e 104. A combinação destes métodos apenas não permitiu identificar ao nível da subespécie dois isolados de *M. avium* tendo ainda sido possível confirmar a identificação de 11 isolados de *M. intracellulare*. Foi ainda possível verificar que entre os isolados inicialmente identificados como *M. intracellulare*, nove pertencem à espécie *M. chimaera*, dois pertencem à espécie *M. colombiense* e um pertence à espécie *M. marseillense*. Assim,

de todos os isolados clínicos estudados no presente trabalho apenas um apresentou identificação inconclusiva, uma vez que os resultados obtidos para este isolado nos diferentes métodos testados foram inconsistentes.

Posteriormente, procurou-se comparar e diferenciar os isolados clínicos através de métodos genotípicos e/ou fenotípicos. A tipagem fenotípica de todos os isolados de *M. avium* (incluindo as duas estirpes de referência de *M. avium*) e *M. intracellulare* foi feita através de testes de suscetibilidade a diversos antibióticos, nomeadamente: claritromicina, etambutol, moxifloxacina, rifampicina, rifabutina e amicacina. Os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos obtidos na literatura, tendo a claritromicina e amicacina sido os antibióticos a apresentar a menor percentagem de isolados resistentes e a maior percentagem de isolados sensíveis (70,83 % e 85,42 %, respetivamente). Em contra partida, o etambutol e a rifabutina foram os antibióticos com a maior percentagem de isolados resistentes (70,83 %) tendo a percentagem de isolados sensíveis sido de 4,17 % e 22,92 %, respetivamente. Verificou-se ainda que para a claritromicina, rifabutina e etambutol a maioria dos isolados possui uma CMI acima do pico sérico máximo no ser humano o que sugere, que em caso de infeção no Homem, estes isolados podem permanecer ativos uma vez que o antibiótico não atinge níveis séricos inibitórios.

A comparação genotípica foi feita apenas para isolados clínicos de *M. avium* recorrendo-se à tipagem por *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR*. Além da comparação dos isolados, pretendia-se também verificar se os métodos de tipagem genotípica referidos possuem um poder discriminatório suficiente para comparar e diferenciar isolados. A análise de sequências *MIRU-VNTR* permitiu observar a existência de 15 perfis *MIRU-VNTR* distintos. Obteve-se um total 11 isolados distribuídos em três *clusters* tendo os restantes isolados apresentado um perfil único. A tipagem por *MATR-VNTR* apresentou um poder discriminatório superior uma vez que se verificou a existência de 18 perfis distintos e a distribuição de nove isolados por quatro *clusters*. A combinação dos dois métodos possibilitou obter o maior poder discriminatório possível, com recurso a estas sequências *VNTR*, sendo que apenas dois isolados permaneceram em *cluster* tendo os restantes apresentado perfis únicos.

Os resultados obtidos mostraram que tanto a tipagem por *MIRU-VNTR* como a tipagem por *MATR-VNTR* possuem um poder discriminatório suficiente para diferenciar a maioria dos isolados, tendo-se obtido o maior poder discriminatório quando os dois métodos foram combinados. Verifica-se então, que amostra de estudo é bastante diversa e possui uma baixa clonalidade uma vez que só dois isolados permaneceram em *cluster*. A diversidade da amostra ocorreu tanto a nível genotípico como a nível fenotípico tornando assim difícil perceber de que forma estes isolados se encontram relacionados.

Palavras chave: Micobactérias não-tuberculosas (MNT); Complexo *Mycobacterium avium* (MAC); *MIRU-VNTR*; *MATR-VNTR*; poder discriminatório.

Abstract

In recent years there has been an increase in the number of cases of disease of nontuberculous mycobacterial infection (NTM). These mycobacteria are opportunistic pathogenic microorganisms that have a wide variety of hosts, being able to infect humans and animals. They can be found in the most various environments, such as, soil and water. In the case of humans, immunocompromised individuals are the most susceptible to MNT infections, despite not existing any evidence of person-to-person transmission. From the clinical point of view, those infections are mainly manifested at the respiratory level, and may also infect other organs, and in some cases, especially in immunocompromised individuals, disseminated infection may occur.

The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is the main nontuberculous mycobacterial complex, being *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* the main species of this complex. The species *M. avium* is further divided into subspecies *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Comparison and differentiation of clinical isolates of *M. avium* and *M. intracellulare* is not easy either because of their phylogenetic proximity or the low growth rate of isolates. Thus, for this purpose, some genotypic methods, mainly based on PCR, are frequently used, as well as some phenotypic techniques, such as susceptibility tests to various antibiotics.

The present work aimed to characterize the population structure and resistance levels of a set of clinical isolates of microorganisms belonging to MAC in Portugal, namely *M. avium* and *M. intracellulare*. To this end, we began to identify 24 clinical isolates of *M. intracellulare* and to identify, at subspecies level, the 22 clinical isolates of *M. avium* obtained from various laboratories and hospitals in the Lisbon region. Initially, we sought to identify each of these isolates by amplifying several *loci* within which the IS900, IS901, IS1245 and IS1311 insertion sequences stand out. Five amplification profiles incompatible with the species studied were obtained. Five clinical isolates of *M. intracellulare* and two clinical isolates of *M. avium* could not be identified using this method, and it is suspected that among the clinical isolates of *M. intracellulare* there could be isolates belonging to the species *M. chimaera*, as this species appears, due to the limitations of the GenoType test, often misidentified as *M. intracellulare*.

Thus, in order to discriminate between *M. intracellulare* and *M. chimaera* in isolates initially identified as *M. intracellulare* by the GenoType test, we then sought to discriminate and evaluate the prevalence of *M. chimaera* in the sample studied by amplifying the SR1 gene (*M. chimaera* specific). This gene was amplified in nine of the 24 isolates initially identified as *M. intracellulare*, thus suggesting that these isolates should in fact belong to the *M. chimaera* species. However, none of these nine isolates matched the five isolates with species-incompatible insertion sequence amplification profiles, so the amplification, purification and sequencing of the ITS *locus* and the *hsp65* gene (this one only for a smaller group) were performed. All 24 isolates of *M. intracellulare*, three isolates of *M. avium* and the reference strains *M. avium* ATCC25291 and 104 were included in this test. The combination of these methods alone did not allow the identification of two isolates of *M. avium* at subspecies level. It was still possible to confirm the identification of 11 isolates of *M. intracellulare*. It was also possible to verify that among the isolates identified as *M. intracellulare*, nine belong to the species *M. chimaera*, two belong to the species *M. colombiense* and one belongs to the species *M. marseillense*. Thus, of all the clinical isolates studied in the present work, only one presented inconclusive identification, since the results obtained for this isolate in the different tested methods were inconsistent.

Subsequently, we sought to compare and differentiate clinical isolates by genotypic and / or phenotypic methods. Phenotypic typing of all *M. avium* isolates (including the two reference strains of *M. avium*) and *M. intracellulare* was performed by testing the susceptibility to various antibiotics, namely: clarithromycin, ethambutol, moxifloxacin, rifampicin, rifabutin and amikacin. The results obtained were very similar to those obtained in the literature, having clarithromycin and amikacin been the antibiotics with the lowest percentage of resistant isolates and the highest percentage of sensitive isolates (70.83% and 85.42%, respectively). In contrast, ethambutol and rifabutin were the antibiotics with the highest percentage of resistant isolates (70.83%) with the percentage of sensitive isolates being 4.17% and 22.92%, respectively. It was also found that for clarithromycin, rifabutin and ethambutol most isolates have a MIC above Cmax suggesting that in case of infection in humans, these isolates may remain active as the antibiotic does not reach inhibitory serum levels.

Genotypic comparison was performed only for clinical isolates of *M. avium* using MIRU-VNTR and MATR-VNTR typing. In addition to the comparison of isolates, we also intended to verify whether the referred genotyping methods have sufficient discriminatory power to compare and differentiate isolates. MIRU-VNTR sequence analysis showed 15 distinct MIRU-VNTR profiles. A total of 11 isolates were distributed in three clusters and the remaining isolates presented a unique profile. MATR-VNTR typing had a higher discriminatory power as there were 18 distinct profiles and the distribution of nine isolates by four clusters. The combination of the two methods made it possible to obtain the highest discriminatory power possible, using these VNTR sequences, and only two isolates remained clustered while the others presented unique profiles.

The results showed that both MIRU-VNTR typing and MATR-VNTR typing have sufficient discriminatory power to differentiate most isolates, and the highest discriminatory power was obtained when the two methods were combined. Thus, it is verified that the study sample is quite diverse and has a low clonality since only two isolates remained in cluster. The diversity of the sample occurred at both genotypic and phenotypic levels, making it difficult to understand how these isolates are related.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria (NTM); *Mycobacterium avium* complex (MAC); MIRU-VNTR; MATR-VNTR; discriminatory power.

Lista de abreviaturas e acrónimos

MNT – micobactérias não-tuberculosas

MAC – Complexo *Mycobacterium avium*

MAH – *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

MAV – *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

ATCC – *American Type Culture Collection*

RGM – micobactéria de crescimento rápido (*Rapidly growing mycobacteria*)

PCR – reação de polimerização em cadeia (*polymerase chain reaction*)

dNTP – desoxirribonucleótidos

MgCl₂ – cloreto de magnésio

IS – sequência de inserção

bp – par de bases

RFLP – polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism*)

PFGE – eletroforese em gel de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*)

MLST – tipagem de sequência multilocus (*multilocus sequence typing*)

MLSSR – repetição de sequência curta multi-locus (*multi-locus short sequence repeat*)

VNTR – número variável de repetição em *tandem* (*variable number tandem repeat*)

MIRU – unidades repetitivas intercaladas micobacterianas (*mycobacterial interspersed repetitive units*)

MATR – repetições em *tandem* de *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium tandem repeats*)

CMI – concentração mínima inibitória

C_{max} – concentração máxima

CLA – claritromicina

RIB – rifabutina

EMB – etambutol

MXF – moxifloxacina

RIF – rifampicina

AMK – amicacina

Índice

Agradecimentos.....	iii
Artigos publicados:	iv
Resumo.....	v
Abstract	vii
Lista de abreviaturas e acrónimos	ix
Lista de tabelas	xii
Lista de figuras	xiii
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1 – Género <i>Mycobacterium</i> : aspetos morfológicos e fisiológicos.....	1
1.2 – Taxonomia do MAC.....	2
1.3 – Epidemiologia da infeção pelo MAC.....	3
1.4 – Nicho ecológico.....	4
1.5 – Clínica da infeção.....	5
1.6 – Terapêutica de infeções causadas por MNT.....	6
1.7 – Identificação e tipagem de isolados do complexo <i>Mycobacterium avium</i>	8
1.7.1 – Diferenciação de espécies e subespécies do complexo <i>Mycobacterium avium</i> : abordagens moleculares.....	9
1.7.2 – Métodos de tipagem genotípicos	11
1.7.3 – Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	13
1.8 – Objetivos	15
1.9 – Estratégia experimental	15
Capítulo 2 – Material e métodos	16
2.1 – Isolados clínicos e extração de DNA.....	16
2.2 – Identificação molecular dos isolados clínicos	16
2.3 – Identificação molecular de <i>M. chimaera</i> : amplificação do gene SR1	17
2.4 – Amplificação, purificação e sequenciação do gene <i>hsp65</i> e do locus ITS	17
2.5- Suscetibilidade a antimicrobianos: determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)...18	
2.6 – Genotipagem de isolados clínicos de <i>M. avium</i> : <i>MIRU-VNTR</i>	20
2.7 – Genotipagem de isolados clínicos de <i>M. avium</i> : <i>MATR-VNTR</i>	21
2.8 – Análise filogenética, <i>clustering</i> hierárquico e diversidade alélica	22
Capítulo 3 – Resultados e discussão.....	23
3.1 – Caraterização da amostra e relevância epidemiológica de <i>M. avium</i> e <i>M. intracellulare</i>	23
3.2 – Identificação dos isolados clínicos	24
3.3 – Identificação dos isolados de <i>M. chimaera</i>	26
3.4 – Identificação dos isolados clínicos discordantes: caraterização do locus ITS e gene <i>hsp65</i>	28

3.5 – Níveis de resistência aos antibióticos	34
3.6 – Diversidade genotípica de <i>M. avium</i> : tipificação por <i>MIRU-VNTR</i>	38
3.7 – Diversidade genotípica de <i>M. avium</i> : tipificação por <i>MATR-VNTR</i>	41
3.8 – Diversidade genotípica de <i>M. avium</i> : abordagem combinada com <i>MIRU-VNTR</i> e <i>MATR-VNTR</i>	43
Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras	46
4.1 – Conclusões	46
4.2 – Perspectivas futuras	47
Referências Bibliográficas	49
Apêndices	61
Soluções	61

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Distribuição de algumas das principais MNT de acordo com o seu crescimento	2
Tabela 1.2 – Critérios de interpretação para resultados de PCR de múltiplos genes de microrganismos MAC.....	9
Tabela 2.1 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos <i>loci</i> usados na identificação dos isolados.....	17
Tabela 2.2 – Pontes de corte sugeridos para a classificação fenotípica dos isolados enquanto resistentes, intermédios ou suscetíveis.....	19
Tabela 2.3 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados e temperatura de <i>annealing</i> para os oito <i>loci</i> <i>VNTR</i> utilizados.....	20
Tabela 2.4 – Número de repetições com base no tamanho dos amplicões para os oito <i>loci</i> <i>MIRU-VNTR</i> em <i>M. avium</i>	21
Tabela 2.5 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de 12 <i>loci</i> <i>MATR-VNTR</i>	21
Tabela 2.6 – Número de repetições com base no tamanho dos amplicões para os <i>loci</i> <i>MATR</i>	22
Tabela 3.1 – Caracterização dos isolados clínicos e respetiva distribuição.....	23
Tabela 3.2 – Resultados da amplificação dos quatro <i>loci</i> testados nos 46 isolados clínicos e nas duas estirpes de referência de <i>M. avium</i>	25
Tabela 3.3 – Amplificação do gene <i>SR1</i> nos 24 isolados clínicos inicialmente identificados como <i>M. intracellulare</i>	27
Tabela 3.4 – Identificação de isolados clínicos incluídos no estudo através da sequenciação do <i>locus</i> <i>ITS</i>	29
Tabela 3.5 – Identificação dos isolados clínicos incluídos no estudo através da sequenciação do gene <i>hsp65</i>	31
Tabela 3.6 – Identificação presumtiva dos 46 isolados clínicos	31
Tabela 3.7 – Suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos incluídos no estudo.....	37
Tabela 3.8 – Genotipagem dos isolados clínicos de <i>M. avium</i> através da caracterização alélica de sete <i>loci</i> de <i>MIRU-VNTR</i> previamente descritos por Thibault <i>et al</i> (2007).....	39
Tabela 3.9 – Distribuição alélica entre os isolados de <i>M. avium</i> determinada por tipagem <i>MIRU-VNTR</i>	40
Tabela 3.10 – Distribuição alélica entre os isolados de <i>M. avium</i> determinada por tipagem <i>MATR-VNTR</i>	42
Tabela 3.11 – Poder discriminatório da tipagem por <i>MIRU-VNTR</i> e por <i>MATR-VNTR</i> nos isolados clínicos de <i>M. avium</i>	44

Lista de figuras

Figura 1.1 – Exemplo de um isolado de <i>M. avium</i> crescido em meio de cultura Lowenstein-Jensen.....	2
Figura 1.2 – Distribuição das MNT mais comuns a nível mundial em 2008.....	4
Figura 1.3 – Possíveis fontes de infecção por micobactérias pertencentes ao MAC.....	5
Figura 1.4 – Eficácia da administração prolongada de etambutol e azitromicina na redução da carga microbiana.....	8
Figura 1.5 - Ilustração do teste rápido GenoType NTM-DR.....	10
Figura 1.6 – Ilustração da estrutura típica dos <i>MIRUs</i> ao longo do genoma.....	12
Figura 1.7 – Parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica relacionados com a evolução clínica..	14
Figura 2.1 – Ilustração das placas de 96 poços utilizadas na realização dos testes de suscetibilidade.....	19
Figura 3.1 – Exemplos de amplificação positiva do gene SR1 em seis isolados clínicos.....	27
Figura 3.2 – Exemplos de amplificação positiva do <i>locus</i> ITS em 19 isolados clínicos.....	29
Figura 3.3 – Árvore filogenética construído a partir da sequenciação do <i>locus</i> ITS com recurso à ferramenta: Itol Interactive Tree Of Live.....	33
Figura 3.4 – Distribuição da CMI, CMI ₅₀ , CMI ₉₀ e Cmax dos fármacos usados contra MAC.....	35
Figura 3.5 – Distribuição do isolados de acordo com a respetiva suscetibilidade aos antibióticos.....	36
Figura 3.6 – Dendrograma construído, com o método UPGMA, com base no perfil <i>MIRU-VNTR</i> através da adaptação dos dados obtidos pela ferramenta MIRU-VNTRplus (Weniger <i>et al.</i> , 2010), para os isolados clínicos de <i>M. avium</i>	41
Figura 3.7 – Exemplo de 31 amplicões (representativos) associados a um determinado número de repetições em <i>tandem</i> para os 12 loci <i>MATR-VNTR</i>	42
Figura 3.8 – Dendrograma construído, com o método UPGMA, com base no perfil <i>MATR-VNTR</i> através da adaptação dos dados obtidos pela ferramenta MIRU-VNTRplus (Weniger <i>et al.</i> , 2010), para os isolados clínicos de <i>M. avium</i>	43
Figura 3.9 – Dendrograma construído, com o método UPGMA, com base nos perfis <i>MIRU-VNTR</i> e <i>MATR-VNTR</i> através da adaptação dos dados obtidos para a ferramenta MIRU-VNTRplus (Weniger <i>et al.</i> , 2010), para isolados clínicos de <i>M. avium</i>	44

1.1 – Género *Mycobacterium*: aspetos morfológicos e fisiológicos

Embora a maioria das infeções por micobactérias sejam causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, as infeções oportunistas por micobactérias não-tuberculosas (MNT) (Figura 1.1) representam um desafio de saúde pública crescente (van Ingen *et al.*, 2009) tendo vindo a aumentar a nível mundial (Nishiuchi *et al.*, 2007; Tortoli, 2014).

Também designadas por micobactérias atípicas (Inderlied *et al.*, 1993; Whiley *et al.*, 2012), as MNT constituem um grupo artificial de espécies que englobam todas as espécies de *Mycobacterium* não pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Covert *et al.*, 1999; Falkinham, 1996). As MNT são comumente classificadas como Gram-positivas, embora não seja possível corar estas micobactérias pelo método de Gram (Liu *et al.*, 1996). Assim, as MNT são designadas de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) uma vez que não coram sob ação de ácidos fortes nem de álcool sendo necessário uma mistura álcool-ácido para esse efeito. Esta propriedade dificulta a identificação das micobactérias pelo que técnicas de coloração mais avançadas, como *Ziehl-Neelsen* ou auramina-rodamina, são geralmente usadas (Jeyanathan *et al.*, 2006).

As micobactérias são microrganismos aeróbios, sem motilidade, não formadores de esporos (Akram & Attia, 2018) que apresentam morfologia de bastonetes (0,2-0,6 µm de largura × 1,0-10 µm de comprimento) retilíneos ou ligeiramente encurvados (Madigan *et al.*, 2009) e que possuem uma parede celular hidrofóbica rica em lípidos, os ácidos micólicos, que a tornam substancialmente mais espessa do que a maioria das paredes das outras bactérias (Liu *et al.*, 1996; Ray & Ryan, 2011). A espessura, a composição da parede celular e a capacidade de formar biofilmes tornam as micobactérias impermeáveis a nutrientes hidrofílicos e resistentes a metais pesados, desinfetantes e antibióticos (Falkinham, 2007; Johnson & Odell, 2014; Kim *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2010). Estas bactérias são ainda resistentes ao baixo pH (Bodmer *et al.*, 2000) e a elevadas temperaturas sendo que, embora a sua temperatura ótima de crescimento seja geralmente de 37 °C (Ray & Ryan, 2011), estes microrganismos podem suportar temperaturas até 60 °C (Falkinham, 2015; Schulze-Robbeke & Buchholtz, 1992). Existem algumas exceções como é o caso de *M. marinum* e *M. ulcerans* que possuem temperaturas ótimas de crescimento de 30 °C (Ray & Ryan, 2011).

Em termos históricos, as bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium* (principal complexo de micobactérias não-tuberculosas) foram identificadas em 1890, contudo só 50 anos mais tarde é que foram reconhecidos enquanto agentes etiológicos de doença no homem. A principal espécie deste complexo (*M. avium*) foi isolada pela primeira vez em 1933 em galináceos (Akram & Attia, 2018) e o primeiro caso de infeção pulmonar no ser humano devido a MNT foi relatado em 1943 em um doente idoso (Field *et al.*, 2004).



Figura 1.1 – Exemplo de um isolado de *M. avium* crescido em meio de cultura Lowenstein-Jensen (obtido de: este trabalho).

1.2 – Taxonomia do MAC

Atualmente, existem mais de 170 espécies oficialmente reconhecidas de *Mycobacterium* (199 espécies citadas em “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” em Agosto de 2019), o único gênero da família *Mycobacteriaceae* (Daley, 2017; Forbes, 2017). Do grupo das micobactérias não-tuberculosas, as bactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) são os principais agentes responsáveis por infecções pulmonares (Alffenaar & van Ingen, 2017). Estas micobactérias englobam principalmente as espécies *M. avium* e *M. intracellulare* (Hwang *et al.*, 2017; Jeon *et al.*, 2014; Vluggen *et al.*, 2016) contudo, devido ao avanço das técnicas moleculares, novas espécies pertencentes ao MAC têm sido descobertas. Assim, o MAC é constituído pelas espécies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. yongonense*, *M. bouchodurhonense*, e *M. indicus pranii* (Castejon *et al.*, 2018; Jeon *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2010).

Quanto ao crescimento, as micobactérias atípicas podem apresentar crescimento lento ou crescimento rápido dependendo do tempo de formação de colónias (Tabela 1.1). Para as micobactérias de crescimento lento é possível observar a formação de colónias sete dias após a cultura. Em contrapartida, para as micobactérias de crescimento rápido (RGM) é possível observar a formação de colónias em menos de sete dias (Kankya *et al.*, 2011; van Ingen *et al.*, 2009).

Tabela 1.1 - Distribuição de algumas das principais micobactérias atípicas de acordo com o seu crescimento (obtido e adaptado de: Falkinham, 2009).

Micobactérias de crescimento lento	Micobactérias de crescimento rápido
<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. simiae</i>	
<i>M. marinum</i>	
<i>M. malmoeense</i>	

A espécie *M. avium* é ainda subdividida nas subespécies *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis* que embora pertençam à mesma espécie apresentam diferenças genómicas e diferentes tropismos para os seus hospedeiros (Adachi *et al.*, 2016; Ashworth Dirac *et al.*, 2013; Uchiya *et al.*, 2017).

Embora estas subespécies tenham sido consideradas durante muito tempo como espécies distintas, a análise genética permitiu verificar, através da similaridade do gene que codifica para o rRNA 16S, que se trata da mesma espécie (Turenne *et al.*, 2008). *M. avium* subsp. *hominissuis* é um patógeno intracelular oportunista para humanos e suínos podendo ocasionalmente infetar outros animais (Rindi *et al.*, 2018). *M. avium* subsp. *avium* infeta principalmente aves podendo no entanto, em algumas situações, causar infeções em humanos, suínos e outros mamíferos (Muwonge *et al.*, 2014). *M. avium* subsp. *silvaticum* possui características de crescimento semelhantes às de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, mas a sua composição e estrutura genómica é semelhante à de *M. avium* subsp. *avium* (Rónai *et al.*, 2016) infectando quase exclusivamente pombos-torcazes (Radomski *et al.*, 2010). O conhecimento desta subespécie é muito limitado uma vez que são microrganismos de difícil isolamento (Rónai *et al.*, 2016). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infeta sobretudo ruminantes, sendo o agente etiológico da paratuberculose ou doença de Johne. Além dos ruminantes, pode infetar primatas não humanos e diversas espécies de animais não sendo a imunossupressão necessária para que ocorra infeção. Existem evidências (como as semelhanças histopatológicas e clínicas entre enterite granulomatosa crónica humana, tuberculose intestinal e paratuberculose animal) que sugerem uma associação entre *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e a doença de Crohn (Abubakar *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2010; Thibault *et al.*, 2007) sendo que a capacidade zoonótica desta micobactéria continua a ser objeto de estudo (Shin *et al.*, 2010). Por último, *M. intracellulare* também pode infetar humanos e, ao contrário das subespécies de *M. avium*, a sua estirpe tipo (ATCC13950) foi isolada pela primeira vez a partir de um humano. De facto, trata-se de uma espécie bastante importante do ponto de vista clínico, uma vez que em muitos países (como Japão e Coreia do Sul) apresenta uma prevalência superior à de *M. avium* subsp. *hominissuis* (Nagano *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2010).

As espécies *M. avium* e *M. intracellulare* são genotipicamente e fenotipicamente muito semelhantes, sendo por isso comum os laboratórios referirem-se a ambas como uma única espécie. Clinicamente, além das semelhanças, outras características como dados demográficos, sintomas, características radiológicas e respostas à terapia para pacientes infetados com estas duas espécies são indistinguíveis (Maesaki *et al.*, 1993).

1.3 - Epidemiologia da infeção pelo MAC

Não se tratando de doença de notificação obrigatória na maioria dos países desenvolvidos e sendo sub-diagnosticada na maioria dos países em vias de desenvolvimento (Cassidy *et al.*, 2009; Prevots & Marras, 2015), existe presentemente uma enorme lacuna no conhecimento acerca da epidemiologia global desta infeção. No entanto, a distribuição das infeções por MNT e seus agentes etiológicos tem sido objeto de diferentes estudos com vista a preencher esta lacuna. Embora se tratem na sua maioria de estudos transversais e reportados de forma irregular, estes têm permitido verificar que o Complexo *Mycobacterium avium* compreende as espécies mais relacionados com infeções pulmonares por micobactérias atípicas (Cassidy *et al.*, 2009; Hoefsloot *et al.*, 2013; Koh *et al.*, 2005).

Um estudo de 2008 mostrou que a prevalência do MAC era maior na Austrália, na América do Norte e na Ásia (Figura 1.2 a)) e menor na América do Sul (Hoefsloot *et al.*, 2013). No continente asiático, o Japão foi o país que apresentou maior percentagem de casos de doença devido a infeção por MAC que compreendia 79 % dos isolados. O mesmo estudo mostrou que na Europa, 37 % de casos de doença devido a MNT eram devido a isolados pertencentes ao MAC e que *M. malmoense* foi a espécie responsável pelo menor número de casos de doença (apenas 1 % dos isolados). Em Portugal, o MAC foi responsável por 40 % dos casos de doença devido a infeção por MNT tendo sido assim o principal

responsável por doença pulmonar devido a infecção por micobactérias não-tuberculosas (Hoefsloot *et al.*, 2013).

M. abscessus e *M. fortuitum* foram as micobactérias de crescimento rápido mais frequentemente isoladas em todo o mundo (Hoefsloot *et al.*, 2013) sendo *M. abscessus*, além do MAC, a MNT mais prevalente no continente asiático (Kham-Ngam *et al.*, 2018; Nagano *et al.*, 2017).

No que diz respeito à distribuição do MAC nos diferentes países, verificou-se que a prevalência de *M. avium* foi maior na Europa, América do Norte, América do Sul e Ásia e que a prevalência de *M. intracellulare* foi maior na Austrália e África do Sul (Hoefsloot *et al.*, 2013). Verificou-se ainda que em alguns países do continente asiático, como a Coreia do Sul e o Japão, *M. intracellulare* está mais associada a infecção pulmonar em humanos do que *M. avium* (Jeon *et al.*, 2014; Nagano *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que *M. avium* e *M. intracellulare* apresentam prevalências distintas consoante a região geográfica sendo que, quando analisada a distribuição global, ambas as espécies apresentam uma prevalência relativamente semelhante (Hoefsloot *et al.*, 2013).

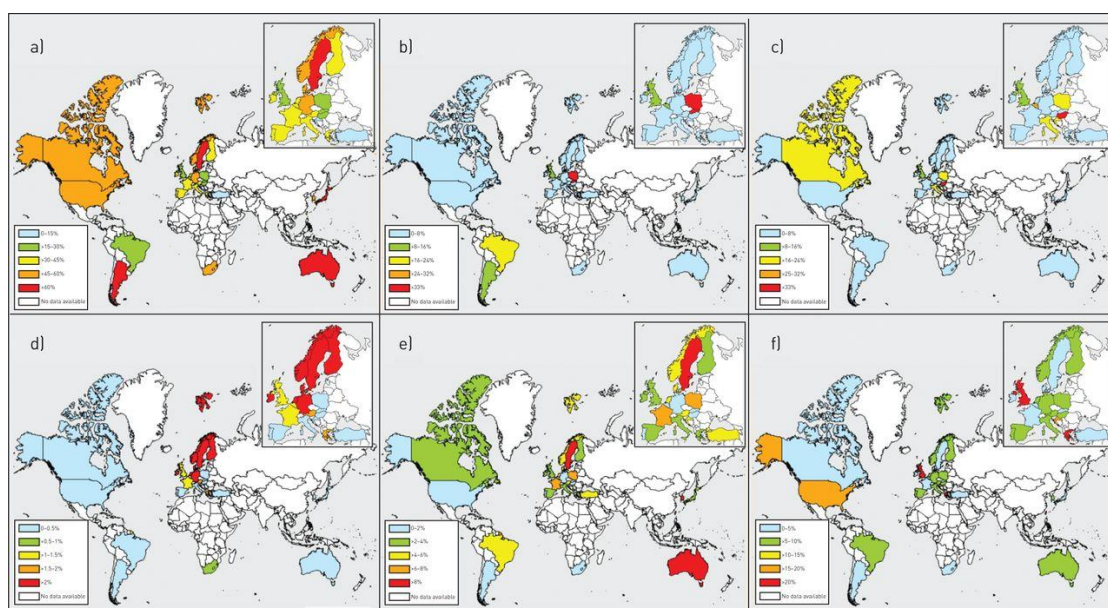


Figura 1.2 - Distribuição das MNT mais comuns a nível mundial em 2008. a) *Mycobacterium avium* complex; b) *M. kansasii*; c) *M. xenopi*; d) *M. malmoense*; e) *M. abscessus*; f) *M. fortuitum* (obtido de: Hoefsloot *et al.*, 2013).

1.4 – Nicho ecológico

As MNT compreendem espécies de distribuição ubíqua encontradas em diversos ecossistemas, sendo comumente encontradas em amostras de água (Bland *et al.*, 2005). São bactérias de vida livre, podendo viver como saprófitas, comensais ou simbiotes (Primm *et al.*, 2004). São parasitas não obrigatórios de humanos que podem ser encontradas em hospedeiros (animais e/ou humanos) ou em amostras ambientais como solo, poeira e água (Figura 1.3) (Falkinham, 2015; Jeon *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2000).

As MNT podem ser encontradas em habitats compartilhados com o homem particularmente na canalização de prédios, hospitais e residências (Falkinham, 2015). Possuem a capacidade de formar biofilmes, o que lhes confere elevada resistência a metais pesados e a desinfetantes como o cloro e a cloramina (Falkinham, 2011; Steed & Falkinham, 2006; Taylor *et al.*, 2000). Estas propriedades das MNT, juntamente com a sua resistência a temperaturas até 60 °C (Falkinham, 2015) dificultam a sua

remoção dos sistemas de distribuição de água (Kim *et al.*, 2017), sendo por isso capazes de colonizar uma grande variedade de superfícies (Bland *et al.*, 2005). Além disso, a capacidade de aderir a superfícies pode estar diretamente relacionado com a sua patogenicidade uma vez que espécies fortemente aderentes são frequentemente descritas como patogénicas (Zamora *et al.*, 2007).

Presentemente, não existem evidências de transmissão de MNT entre seres humanos (Chen *et al.*, 2017) o que sugere que as amostras ambientais (água, solo, aerossóis, etc) desempenham um papel fundamental como veículo de transmissão destas micobactérias (Kankya *et al.*, 2011; Winthrop *et al.*, 2010). Além disso, os protozoários podem ser reservatórios naturais das MNT, podendo estes ter um papel importante na disseminação destes microrganismos. De facto, a coexistência das MNT e dos protozoários nos mesmos habitats levou à formação de relações endossimbióticas entre estes organismos sendo que, em alguns casos, a virulência das bactérias pode aumentar (Cirillo *et al.*, 1997; Strahl *et al.*, 2001; Thomas & McDonnell, 2007).



Figura 1.3 – Possíveis fontes de infecção por micobactérias pertencentes ao MAC (obtido e adaptado de: Nishiuchi *et al.*, 2017).

1.5 – Clínica da infeção

O ser humano é colonizado por um grande número de organismos extrínsecos, estabelecendo com muitos dos quais relações simbióticas. Um microrganismo pode colonizar diferentes tecidos num indivíduo podendo ou não provocar infeção dependendo do tecido infetado e das condições do hospedeiro. Assim, uma bactéria não patogénica, em determinadas circunstâncias (colonização de determinados órgãos, hospedeiro imunocomprometido, etc), pode-se tornar patogénica originando assim infeção. Da mesma forma, uma bactéria patogénica pode colonizar um indivíduo sem, no entanto, provocar infeção no tecido colonizado. Verifica-se então, que uma bactéria pode colonizar o hospedeiro sem, no entanto, provocar infeção sendo que, para que ocorra infeção tem primeiro de haver colonização (Dani, 2014). De acordo com a *American Thoracic Society* (ATS), um indivíduo encontra-se infetado com MNT se: i) os resultados de cultura de duas amostras de expectoração diferentes forem positivas; ii) os resultados de cultura de uma lavagem brônquica forem positivos; iii) a biópsia pulmonar apresentar características histopatológicas micobacterianas (inflamação, granulomas, entre outros) e a amostra (expectoração) for positiva para MNT ou os resultados de cultura de uma lavagem brônquica forem positivos (Griffith *et al.*, 2007).

As MNT são bactérias oportunistas que podem provocar infeção em hospedeiros suscetíveis, sendo que os indivíduos imunodeficientes (por exemplo, indivíduos com SIDA) e imunossuprimidos (doentes oncológicos, recentemente transplantados, etc) se encontram entre os mais afetados. As MNT também conseguem infetar pessoas com o sistema imunitário debilitado (níveis reduzidos de IL-2, IFN- γ , etc) (Chan & Iseman, 2013), indivíduos imunocompetentes com doença prévia (artrite reumatoide, fibrose

quística, bronquiectasia, silicose, pulmão negro, tuberculose prévia, outra doença pulmonar crónica) e idosos podendo a infeção originar patologia respiratória e, em alguns casos, constituir causa de morte (Falkinham, 2011; Nishiuchi *et al.*, 2007; Strahl *et al.*, 2001; Wickremasinghe *et al.*, 2005; Winthrop *et al.*, 2009). Estas micobactérias também podem colonizar indivíduos sem que, no entanto, ocorra desenvolvimento da doença (Kankya *et al.*, 2011), sugerindo assim que o Homem, quando imunocompetente, deve possuir mecanismos que o defendem destes agentes patogénicos.

Os dados demonstram que parece existir uma forte relação entre indivíduos seropositivos para o HIV e infeção por MNT uma vez que o número de casos de infeção devido a MNT começou a aumentar em associação com a pandemia da SIDA (Bodle *et al.*, 2008). Por isso, antes da introdução da terapia antirretroviral de elevada eficácia (HAART), a deteção de micobactérias atípicas em doentes era altamente sugestiva de infeção por HIV (Ishikane & Tanuma, 2014, Le Dantec *et al.*, 2002), verificando-se que 17 % a 50 % dos indivíduos infetados com HIV estavam também infetados com microrganismos pertencentes ao MAC (Horsburgh *et al.*, 1989).

São várias as MNT que podem provocar infeção no ser humano, sendo as espécies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi* e *M. abscessus* as mais relevantes (Kankya *et al.*, 2011). A espécie *M. avium* é a principal responsável por causar doença pulmonar em indivíduos imunocomprometidos e a espécie *M. intracellulare* é a causa mais comum de doença pulmonar em indivíduos não imunocomprometidos (Dauchy *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2014; Kikuchi *et al.*, 2009).

As micobactérias pertencentes ao MAC possuem capacidade zoonótica, sendo que a transmissão de animais para humanos ocorre sobretudo em indivíduos imunocomprometidos (Eisenberg *et al.*, 2012). Sabe-se que nestes indivíduos, *M. avium* consegue invadir o trato intestinal e que a partir daí a bactéria pode atravessar a mucosa intestinal infetando os macrófagos com subsequente disseminação para a uma variedade de tecidos (Greenwell-Wild *et al.*, 2002; Sangari *et al.*, 1999), sendo no entanto os pulmões e os nódulos linfáticos os órgãos tipicamente mais afetados (Chan & Iseman, 2013; Kim *et al.*, 2012). A gravidade da doença pulmonar pode variar de leve a extensa cavitação e destruição do tecido pulmonar podendo originar insuficiência respiratória (Alffenaar & van Ingen, 2017). As MNT também podem provocar infeções oculares com crescente associação à morbilidade ocular (Aung *et al.*, 2016).

Como a maioria das infeções, uma infeção por MNT pode originar doença sendo esta acompanhada de alguns sintomas como tosse, produção de expectoração, dispneia, hemoptise, entre outros. Tratando-se de quadros clínicos pouco específicos, com sintomatologia transversal a outras doenças respiratórias, o diagnóstico pode ser difícil (Wickremasinghe *et al.*, 2005). Acresce o facto das MNT serem frequentemente e erroneamente diagnosticadas inicialmente como *M. tuberculosis* uma vez que reagem positivamente ao teste da tuberculina (falsos positivos) dificultando ainda mais a obtenção de um diagnóstico correto (Kankya *et al.*, 2011).

1.6 – Terapêutica de infeções causadas por MNT

No tratamento de infeções por MNT, um diagnóstico correto e identificação ao nível da espécie é fundamental para instituição da terapêutica adequada sendo que, antes de se iniciar o tratamento, se deve ter em conta o historial clínico do doente (doente oncológico, doenças pulmonares prévias, etc) (Johnson & Odell, 2014).

Inicialmente, os antibióticos usados no tratamento da tuberculose eram também usados para tratar doentes infetados com MAC sendo, no entanto, a eficácia do tratamento pouco satisfatória. Só depois da introdução dos macrólidos no tratamento de infeções por MAC é que o sucesso do tratamento aumentou consideravelmente (Xu *et al.*, 2014), sendo a taxa de sucesso terapêutico de cerca de 75 %

(Schön & Chryssanthou, 2017). As diretrizes da *American Thoracic Society* (ATS) recomendam, no tratamento de infecções provocados por bactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC), um regime de combinação de três medicamentos administrados por pelo menos 12 meses (Kwon *et al.*, 2019).

Assim, no tratamento de doentes infetados com MAC, é comum o uso de terapêutica combinada com recurso a um macrólido sendo a claritromicina e a azitromicina bastante utilizados (Kwon *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2017). Estes antibióticos são bacteriostáticos e inibem a região da peptidiltransferase na subunidade 50S impedindo a síntese proteica (Meier *et al.*, 1994). Os macrólidos são habitualmente administrados em conjunto com outros fármacos como rifamicinas, etambutol e estreptomicina ou ampicilina (Kwon *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2014).

As fluoroquinolonas também mostraram ser bastante eficazes no tratamento de infecções por micobactérias tendo-se verificado que a adição moxifloxacina (fluoroquinolona) pode aumentar a eficácia do tratamento uma vez que a adição deste antibiótico permitiu tratar murganinhos infetados com MAC e com doença pulmonar persistente após o tratamento baseado em claritromicina (Koh *et al.*, 2013). Além do MAC, a moxifloxacina e a gatifloxacina (outra fluoroquinolona) também podem ser eficazes contra micobactérias de crescimento rápido como *M. abscessus* (De Groote & Huitt, 2006; Park *et al.*, 2008). Contudo, e embora as fluoroquinolonas possam apresentar resultados positivos no combate a infecções por MNT, a sua utilização como terapia medicamentosa deve ser alvo de novos estudos principalmente devido ao risco de as micobactérias adquirirem resistências, tendo-se verificado, no estudo de Koh *et al.* (2013), que a adição de moxifloxacina ao tratamento aumentou a proporção de isolados resistentes à claritromicina e à moxifloxacina. Assim, o uso de fluoroquinolonas no tratamento de infecções por MNT deve ocorrer de forma moderada e não contínua (De Groote & Huitt, 2006; Koh *et al.*, 2013).

O uso de terapia combinada parece ser fundamental uma vez que se verificou que quando se usa monoterapia com macrólidos, as micobactérias tornam-se rapidamente resistentes (Nash & Inderlied, 1995) o que pode ser explicado através da análise do genoma, uma vez que é sugerido que as micobactérias pertencentes ao MAC possuem apenas uma cópia do gene 23S e portanto, uma simples mutação neste gene pode desencadear na aquisição de resistência (Meier *et al.*, 1996).

A importância da terapia combinada pode ser visualizada no estudo de Srivastava *et al.* (2017), que procurou verificar se a ação de dois fármacos (etambutol e azitromicina) seria suficiente para eliminar micobactérias pertencentes ao MAC (Figura 1.4). Verificou-se que após alguns dias, a combinação dos dois fármacos tinha-se tornado ineficaz, sendo que no final da experiência a percentagem de bactérias sujeitas ao tratamento que tinham adquirido resistência era bastante superior ao do início da experiência (dados não mostrados). Verificou-se então que a combinação destes dois fármacos não é muito eficaz na eliminação de isolados do MAC, pelo que a utilização de um terceiro antibiótico (rifamicina) deve ser considerado (Srivastava *et al.*, 2017).

Embora os macrólidos sejam mais eficientes no tratamento de infecções por MAC do que os fármacos antituberculose, a sua introdução trouxe algumas desvantagens uma vez que estes fármacos podem provocar alguns efeitos secundários como náuseas, vômitos, diarreia, entre outros. Além dos efeitos secundários provocados por cada fármaco, agrava-se ainda o facto destes antibióticos serem administrados de forma combinada o que pode provocar outros efeitos adversos (sobretudo problemas gastrointestinais) devido à toxicidade provocada pela interação entre os fármacos usados (Griffith, 1999).

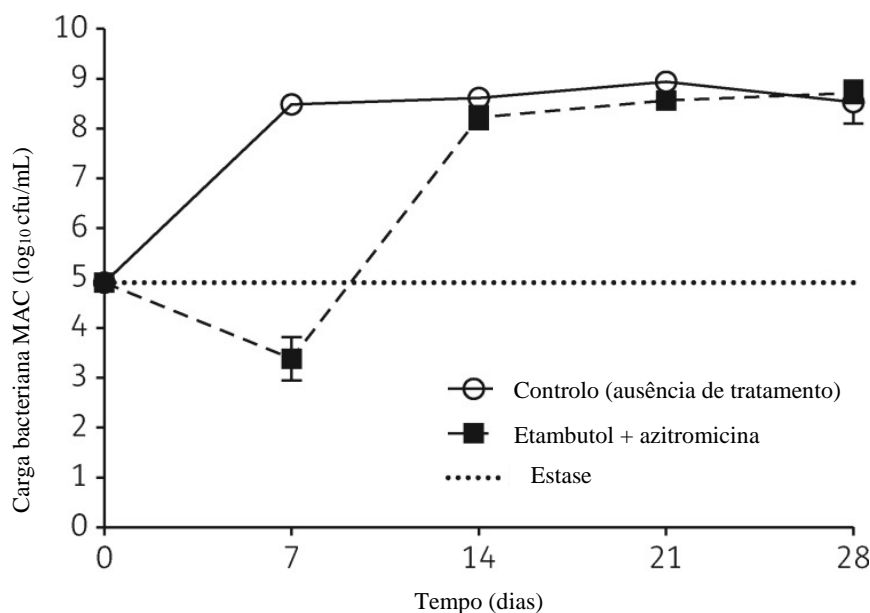


Figura 1.4 – Eficácia da administração prolongada de etambutol e azitromicina na redução da carga microbiana (obtido e adaptado de: Srivastava *et al.*, 2017).

1.7 – Identificação e tipagem de isolados do complexo *Mycobacterium avium*

O género *Mycobacterium* é um grupo taxonómico cujo os membros possuem características fenotípicas e genotípicas particulares permitindo a sua distinção de outros géneros (Fedrizzi *et al.*, 2017). Tem-se verificado que em muitos países, sobretudo em países pouco desenvolvidos e de capacidade laboratorial limitada, que as MNT são pouco estudadas uma vez que a pesquisa se centra essencialmente nas micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Muwonge *et al.*, 2014). Existe por isso uma enorme necessidade de identificar corretamente as MNT uma vez que a capacidade de comparar diferentes estirpes destes microrganismos permitirá uma melhor compreensão das fontes de doença, surtos clínicos, recorrências e dinâmica populacional (Iakhiaeva *et al.*, 2013).

A descrição das sequências genómicas das estirpes *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 e *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 (estirpes de referência) constituiu um importante marco uma vez que possibilitou verificar que a espécie *M. avium* é bastante diferente de outras espécies de micobactérias e que as suas subespécies também apresentam diferenças genómicas consideráveis (Turenne *et al.*, 2008). Existem várias abordagens para a deteção de microrganismos pertencentes ao MAC em diversas amostras sendo que os métodos genotípicos são geralmente mais utilizados uma vez que possuem um poder discriminatório superior aos métodos fenotípicos tradicionais (Jeon *et al.*, 2014). Contudo, tanto os métodos genotípicos como os métodos fenotípicos estão limitados pela reduzida taxa de crescimento destas micobactérias que ao nível da tipificação molecular retarda a execução da mesma até ao ponto em que seja possível obter uma quantidade de DNA suficiente (Kalvisa *et al.*, 2016; Turenne *et al.*, 2008). Outra limitação dos métodos genotípicos é o facto de algumas espécies do MAC possuírem poucos marcadores que possam ser usados na deteção da variabilidade genética intraespecífica também assim limitando a capacidade de discriminação de diferentes isolados (Kalvisa *et al.*, 2016).

1.7.1 – Diferenciação de espécies e subespécies do complexo *Mycobacterium avium*: abordagens moleculares

A identificação de espécies e de subespécies do MAC pode ser feita através de um PCR múltiplo (ou vários PCRs) com recurso a determinados genes e sequências de inserção através da pesquisa da sua presença/ausência. As sequências de inserção estão presentes em diversas subespécies de *M. avium* sendo por isso utilizadas como marcadores para sua identificação genotípica (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010). Assim, os *loci* frequentemente utilizados na diferenciação de espécies e subespécies do MAC incluem o 16S rDNA específico de micobactérias (Shin *et al.*, 2010), o DT1 (alvo cromossomal) (Shin *et al.*, 2010), a IS1311 (Shin *et al.*, 2010), a IS900 (Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010), a IS901 (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010) e a IS1245 (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006) (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Critérios de interpretação para resultados de PCR de múltiplos genes de microrganismos MAC (obtido e adaptado de: Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010).

Identificação	16S rDNA	IS900	IS901	IS1311	IS1245	DT1
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (serotipo 2 e 3) ou <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	+	-	+	+	+	+
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (serotipo 1)	+	-	+	+	+	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	+	+	-	+	-	-
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	+	-	-	+	+	-
<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	-	-	+
Micobactérias não MAC	+	-	-	-	-	-
Espécies não micobacterianas	-	-	-	-	-	-

O gene 16S específico das micobactérias está presente em todas as micobactérias sendo por isso usado apenas como controlo positivo. Relativamente aos restantes *loci*, verifica-se que a IS1311 está presente em todas as subespécies de *M. avium* (Shin *et al.*, 2010), a IS900 apenas está presente em *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010), a IS901 apenas está presente em *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *silvaticum* (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010) e a IS1245 está presente em todas as subespécies de *M. avium* (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006), com exceção de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Bartos *et al.*, 2006). Nenhum destes *loci* é específico para *M. avium* subsp. *hominissuis* pelo que este só pode ser identificado, através deste método, pela presença das sequências de inserção IS1245 e IS1311 e pela ausência dos restantes *loci*. Assim, as subespécies *M. avium* subsp. *avium* (serotipo 2 e 3) e *M. avium* subsp. *silvaticum* são as únicas subespécies que não podem ser diferenciados através da amplificação destes *loci* (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010).

Por fim, a espécie *M. intracellulare* pode ser diferenciada da espécie *M. avium* pela ausência das sequências de inserção e pela presença do gene DT1 (Shin *et al.*, 2010). Esta espécie é ainda muitas vezes identificada como *M. chimaera*, outra espécie de MNT pertencente ao mesmo complexo de

M. avium e *M. intracellulare* (MAC). Assim, para diferenciar a espécie *M. chimaera* da espécie *M. intracellulare* e de outras espécies, pode-se recorrer à amplificação do gene SR1 que é um gene específico *M. chimaera* podendo por isso ser usado para distinguir esta espécie de outras espécies (Zozaya-valdés *et al.*, 2017).

Verifica-se então que este tipo de abordagem permite discriminar as espécies *M. avium* e *M. intracellulare* e as subespécies de *M. avium* (com exceção de *M. avium* subsp. *avium* (serotipo 2 e 3) e *M. avium* subsp. *silvaticum*) o que aumenta a confiança do diagnóstico tratando-se por isso de um método de enorme utilidade não só para caracterização de infeções clínicas por MAC, como também para estudos epidemiológicos (Shin *et al.*, 2010).

A sequenciação completa e a análise comparativa do genoma de um grande número de estirpes relacionadas são outras técnicas genotípicas que surgiram recentemente e que permitem abordar muitas questões microbiológicas como evolução, surtos, resistência a antibióticos e patogenicidade (Ashworth Dirac *et al.*, 2013; Uchiya *et al.*, 2017). Contudo, muitos estudos recorrem apenas à sequenciação de regiões específicas no genoma (como o gene *hsp65* e o locus ITS) para diferenciar espécies (Lechorce *et al.*, 2018). A sequenciação do gene *hsp65*, que codifica para uma proteína de choque térmica, tem sido bastante utilizado para este fim, mostrando ser capaz de diferenciar a grande maioria das 111 espécies de micobactérias (Turenne *et al.*, 2006).

Estão igualmente disponíveis alguns testes comerciais baseados em métodos moleculares sendo os GenoType (Hain Lifesciences) os mais utilizados. Nestes testes, o DNA é sujeito a um PCR *multiplex*, seguido de hibridação reversa e deteção das bandas, sendo a diferenciação das espécies realizada por comparação das bandas obtidas (Huh *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2006). Existem vários testes rápidos para as MNT dentro dos quais se destaca o GenoType NTM-DR que permite a deteção de várias espécies de MNT clinicamente relevantes sendo mesmo possível diferenciar entre *M. intracellulare* e *M. chimaera*. O teste também permite determinar a resistência dos isolados a macrólidos e aminoglicosídeos através da deteção de genes de resistência como por exemplo, o gene *erm* que confere resistência à claritromicina (Figura 1.5). O GenoType CM permite diferenciar o Complexo de *Mycobacterium tuberculosis* das MNT e o GenoType *Mycobacterium* AS permite a diferenciação de 19 espécies de MNT. São testes rápidos que permitem detetar e diferenciar as espécies de MNT clinicamente relevantes sendo por isso, atualmente, bastante utilizados (Huh *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2006; <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm.html>, acessado a 6 de Setembro de 2019 às 18h06).

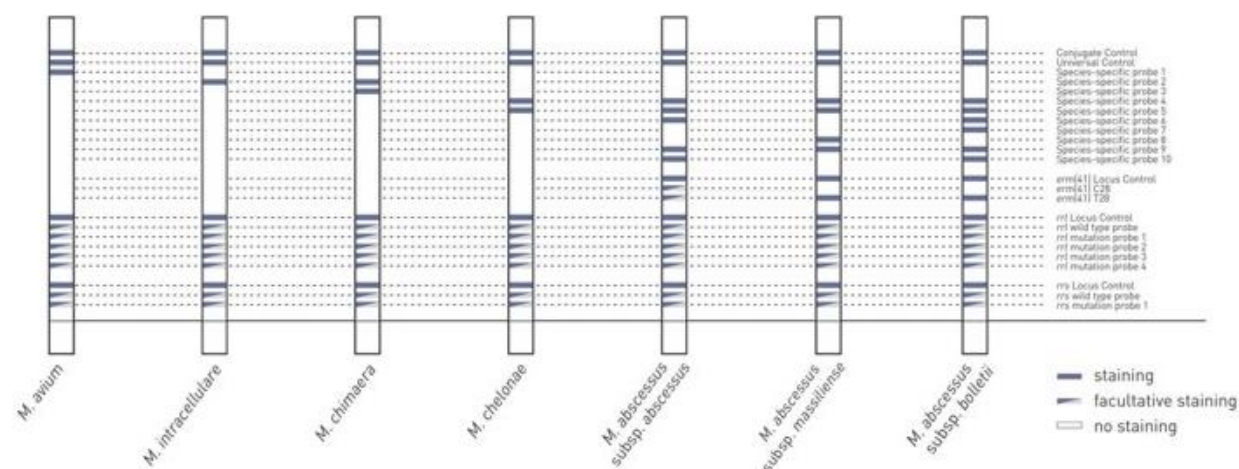


Figura 1.5 – Ilustração do teste rápido GenoType NTM-DR (obtido de: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm.html>, no dia 6 de Setembro às 18h06).

1.7.2 – Métodos de tipagem genotípicos

De modo a comparar e agrupar os diversos isolados da mesma ou de diferentes espécies, vários métodos moleculares foram desenvolvidos. O polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (*RFLP*) combinado com a detecção/mapeamento de elementos de inserção é o principal método molecular usado na tipagem das micobactérias sendo por isso o método de referência. Tem mostrado ser o método com um índice discriminatório mais elevado apresentando um valor, frequentemente, muito próximo de um (Kalvisa *et al.*, 2016) sendo, no entanto, bastante demorado, difícil de implementar e que requer elevadas quantidades de DNA (Ashworth Dirac *et al.*, 2013; Cortés-Torres *et al.*, 2013; Pate *et al.*, 2011; Wojtasik *et al.*, 2012).

Assim como o *RFLP*, a eletroforese em gel de campo pulsado (*PFGE*) é um método de tipificação molecular transversal a diferentes espécies bacterianas e um dos métodos inicialmente aplicados à caracterização de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Este método possui as mesmas desvantagens que o *RFLP* visto que é um método bastante caro e que requer elevada quantidade de DNA (Okuni *et al.*, 2012). Para tentar ultrapassar estas limitações, novas técnicas moleculares baseadas em PCR foram desenvolvidas (Cortés-Torres *et al.*, 2013; Pate *et al.*, 2011).

Um dos principais métodos genotípicos, baseados em PCR, mais utilizados é a amplificação de sequências de *MIRU-VNTR* (*mycobacterial interspersed repetitive units - variable-number of tandem-repeats*), que tira partido da variabilidade no número de repetições em *tandem* de *MIRUs* em diferentes *loci* no genoma das linhagens do MAC (Kalvisa *et al.*, 2016), sendo os *MIRUs* sequências minissatélite que se encontram distribuídas ao longo do genoma como cópias simples ou em repetições múltiplas em *tandem* (Bull *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2017). A análise destas regiões e caracterização alélica baseada no número de repetições presentes permite obter padrões ou perfis genotípicos que podem ser utilizados para comparar e averiguar a proximidade genética entre diferentes isolados (Figura 1.6). Os *MIRUs-VNTR* são portanto marcadores que podem ser usados na genotipagem de diversas espécies de micobactérias (Thibault *et al.*, 2007) tendo-se verificado, que em algumas situações, o aumento do número de *loci* analisados contribui para o aumento do poder discriminatório do teste (Kalvisa *et al.*, 2016).

Para agrupar e diferenciar isolados de *M. avium* através deste método, recorre-se frequentemente a um conjunto de oito *loci* que diferem no tamanho e no número de alelos, sendo a comparação e discriminação dos isolados feita através da comparação dos seus perfis *MIRU-VNTR*. Com recurso à base de dados INMV (base de dados onde estão armazenados todos os perfis *MIRU-VNTR* descritos), o perfil *MIRU-VNTR* (código numérico) pode ser posteriormente convertido no INMV correspondente (Exemplo: o perfil *MIRU-VNTR* 25221129 (perfil de *M. avium* 104) corresponde ao INMV18). Os *loci MIRU-VNTR* utilizados nesta caracterização genética são: MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 47, VNTR 3, VNTR 7, VNTR 10 e VNTR 32 (Eisenberg *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007; http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php?p=fa_nomenclature, acessado a 12 de dezembro de 2018 às 15h00).

Outro método genotípico baseado em PCR bastante utilizado na diferenciação de isolados de *M. avium* é a amplificação e a análise de regiões respetivas designadas por *Mycobacterium avium tandem repeats* (*MATR-VNTR*). Este método permite efetuar a comparação de isolados através da análise dos *VNTRs* e, assim como a análise dos *MIRUs-VNTR*, requer pequenas quantidades de DNA e possui elevada reprodutibilidade. Na prática é um método muito semelhante ao método dos *MIRUs* baseando-se na análise de repetições em 15 *loci MATR* (numerados do 1 ao 16 com exceção do 10) e na obtenção de perfis *MATR-VNTR*, sendo estes usados para comparar e diferenciar isolados (Inagaki *et al.*, 2009).

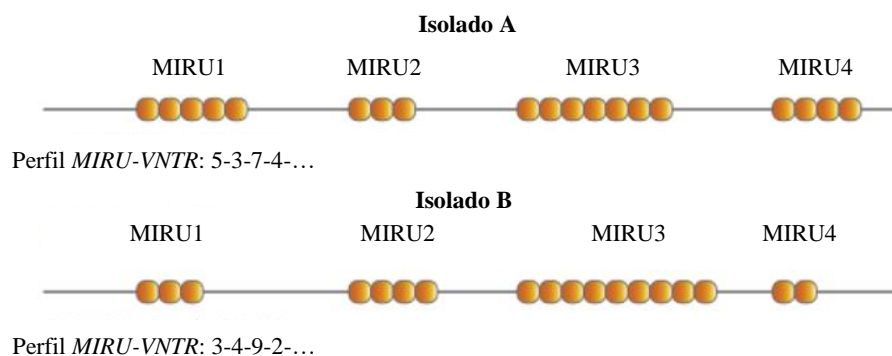


Figura 1.6 – Ilustração da estrutura típica dos *MIRUs* ao longo do genoma verificando-se que o número de repetições em cada *MIRU* pode variar de isolado para isolado (obtido e adaptado de: <http://www.applied-maths.com/applications/mycobacterial-interspersed-repetitive-units-miru-typing>, no dia 12 de dezembro de 2018 às 14h00).

A introdução do método dos *MIRUs* veio permitir discriminar entre dois isolados do mesmo animal (Okuni *et al.*, 2012) tornando-se também bastante importante na tipagem de isolados de *M. intracellulare* uma vez que estas micobactérias não possuem elementos de inserção pelo que não podem ser identificados através dos mesmos. A descrição de sequências genômicas de *M. intracellulare* ATCC13950 T (estirpe de referência) permitiu identificar, no genoma, várias regiões *VNTR* permitindo assim utilizar estas regiões na tipificação de isolados de *M. intracellulare* (Iakhiaeva *et al.*, 2013). Os *loci* frequentemente utilizados na tipificação de *M. intracellulare* são o MIRU 3, o MIN 18, o MIN 19, o MIN 20, o MIN 22, o MIN 31 e o MIN 33 (Dauchy *et al.*, 2010; Iakhiaeva *et al.*, 2013; Jeon *et al.*, 2014).

Do ponto de vista prático, a tipagem por *MIRU-VNTR* é uma técnica bastante fácil de utilizar que pode ser realizada em apenas um dia e que possui uma boa reprodutibilidade e um bom índice discriminatório (Iakhiaeva *et al.*, 2013; Rónai *et al.*, 2016), sendo por isso uma boa alternativa ao método de referência (Cortés-Torres *et al.*, 2013). O maior poder discriminatório é obtido quando as duas técnicas são combinadas (Biet *et al.*, 2012; Thibault *et al.*, 2007). Como desvantagem, além da dificuldade em obter elevadas quantidades de DNA devido ao crescimento lento destes microrganismos, esta técnica pode, contudo, sobreestimar a proximidade genética entre isolados não relacionados (Estoup *et al.*, 2002; Kalvisa *et al.*, 2016).

A análise de *loci* de repetição de sequência curta (*MLSSR*) é outro método genotípico, baseado na existência de repetições em *tandem* ao longo do genoma, que pode ser utilizado na tipagem de isolados de *M. avium*. O método consiste na amplificação por PCR e sequenciação de 11 *loci* (numerados do 1 ao 11) distribuídos ao longo do genoma. As sequências de cada *locus* *SSR* são posteriormente alinhadas e os números de repetições em *tandem* ou número de alelos identificadas através do uso de programas específicos. Com base na distribuição de alelos para cada *locus*, é desta forma possível obter o perfil *MLSSR* para cada isolado, sendo este utilizado para fins de comparação e diferenciação (Amonsin *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2006; <http://mac-inmv.tours.inra.fr> acessado a 10 de setembro de 2019 às 17h00).

A tipagem de sequência multilocus (*MLST*) também tem sido bastante utilizado uma vez que possui elevada reprodutibilidade e não necessita de uma grande quantidade de DNA podendo os resultados ser obtidos de forma bastante rápida. O método consiste em verificar, entre diversos isolados, as diferenças na sequência de DNA de genes conservados. Essas diferenças originam perfis que podem ser usados para distinguir diferentes isolados (Kolb *et al.*, 2014; Turenne *et al.*, 2008).

Verifica-se que são vários os métodos moleculares que permitem a genotipagem de microrganismos MAC. O melhor método será aquele que apresentar maior poder discriminatório, sendo este uma quantidade que reflete a probabilidade de um método colocar dois isolados em grupos genotípicos

distintos (Ashworth Dirac *et al.*, 2013). Assim, a utilidade dos diversos métodos moleculares depende fortemente de sua capacidade de detetar diferenças epidemiologicamente significativas entre isolados (Ahlstrom *et al.*, 2015), sendo a correta identificação dos isolados de extrema importância para estudos epidemiológicos à escala global e no entendimento da dinâmica de transmissão (Ahlstrom *et al.*, 2015; Möbius *et al.*, 2008). Assim, muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de verificar qual o melhor método na discriminação de isolados (Eisenberg *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007) tendo-se verificado que os novos métodos de tipagem molecular (como a tipagem por *MIRU-VNTR* e por *MATR-VNTR*) têm apresentado poderes discriminatórios bastante elevados podendo por isso ser utilizados como alternativa ao método de referência (*RFLP*) (Cortés-Torres *et al.*, 2013). Exemplos disso são os estudos de Inagaki *et al.* (2009) e Thibault *et al.* (2007) onde a tipagem por *MATR-VNTR* e *MIRU-VNTR* (respetivamente) apresentaram um poder discriminatório superior ao *RFLP* de sequências de inserção. Contudo, e como se pode verificar nos trabalhos de Pate *et al.* (2011) e Radomski *et al.* (2010), o *RFLP* de sequências de inserção continua a ser um método bastante válido apresentando constantemente um poder discriminatório bastante elevado. Independentemente do método com maior poder discriminatório todos estes estudos têm em comum o facto de o maior poder discriminatório ser obtido quando os métodos são combinados podendo haver a discriminação total dos isolados que, do ponto de vista clínico e epidemiológico, nem sempre é satisfatório uma vez que se pode atingir um ponto de saturação em que já não se consegue diferenciar mais os isolados podendo também a elevada discriminação dos isolados sugerir erroneamente vias de transmissão e fontes de infeção distintas (Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Thibault *et al.*, 2007).

Verifica-se então que os novos métodos de tipagem molecular baseados na existência de *loci VNTR* ao longo do genoma apresentam um elevado poder discriminatório na diferenciação de isolados possuindo, no entanto, algumas limitações como o facto da evolução convergente dos isolados poder levar a comparações epidemiológicas incorretas. Assim, na discriminação de isolados e em estudos de dinâmica populacional, estes métodos devem ser combinados com outros métodos (*RFLP*, sequenciação do gene *hsp65*, entre outros) e, se possível, recorrer-se à sequenciação completa do genoma (*WGS*) (Ahlstrom *et al.*, 2015).

1.7.3 – Suscetibilidade aos antimicrobianos

Na comparação e diferenciação de isolados, além de testes genotípicos, também é comum o uso de testes fenotípicos dentro dos quais se destaca o teste de suscetibilidade à claritromicina e a outros agentes antimicrobianos. Estes testes de suscetibilidade permitem determinar a concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, a concentração mínima a partir da qual não se observa crescimento microbiano (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015). Trata-se de uma medida *in vitro* da atividade do fármaco sobre os microrganismos (Freitas *et al.*, 2017). Também é comum determinar-se a CMI₅₀ e a CMI₉₀, isto é, a concentração necessária para inibir o crescimento visível de 50 % e 90 % dos isolados, respetivamente, por forma a caracterizar a distribuição epidemiológica do nível de suscetibilidade (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015).

Para as MNT de crescimento lento (MAC, entre outras) recomenda-se o método da microdiluição em placa sendo que, os antibióticos frequentemente testados incluem a amicacina, a rifampicina, claritromicina, o etambutol, a linezolida, a moxifloxacina, a rifabutina, etionamida, isoniazida, ciprofloxacina, entre outros (Jeon *et al.*, 2014; Kontos *et al.*, 2015; Litvinov *et al.* 2018; Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015). De todos os antibióticos frequentemente testados, a claritromicina é o mais usual uma vez que é bastante usado no tratamento de infeções por MNT

(Srivastava *et al.*, 2017), sendo também o que costuma apresentar menor percentagem de isolados resistentes (Jeon *et al.*, 2014; Kontos *et al.*, 2015; Litvinov *et al.* 2018; Mok *et al.*, 2019; Schön & Chrysanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015).

Do ponto de vista clínico, a CMI deve igualmente ser interpretada no contexto dos perfis farmacocinéticos descritos para cada fármaco. Para determinar a concentração e a frequência de administração do fármaco recorre-se a duas disciplinas da área das ciências, sendo elas a farmacocinética e farmacodinâmica. Enquanto a farmacocinética descreve a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de um fármaco, a farmacodinâmica descreve a resposta do indivíduo ao fármaco, bem como o impacto da sua concentração no soro (Freitas *et al.*, 2017). Assim, existem alguns parâmetros que podem ser importantes na determinação do sucesso terapêutico, sendo os principais a CMI, o Cmax e o tempo de semivida antibiótico (Figura 1.7). Quanto mais baixa for a CMI maior será o sucesso do tratamento, uma vez que será necessária uma menor concentração de antibiótico para inativar os microrganismos. O Cmax corresponde à concentração máxima que o antibiótico atinge no soro humano sendo que, para inativar os microrganismos é importante que esta concentração seja superior à CMI. Outro fator que afeta o sucesso terapêutico é o tempo que a concentração do antibiótico permanece acima da CMI ($T > CMI$) sendo que, quanto maior o tempo de atuação, maior é a eficácia do tratamento (Freitas *et al.*, 2017; Roberts & Lipman, 2009).

A determinação destes parâmetros é de extrema importância, uma vez que alguns estudos atuais têm mostrado que alguns dos antibióticos frequentemente usados no tratamento micobacterioses causadas por MNT poderão não ser os mais adequados, tendo-se vindo a verificar uma elevada percentagem de isolados resistentes a esses antibióticos. É assim de extrema importância estudar fármacos alternativos que possam substituir os fármacos atualmente utilizados no tratamento de micobacterioses causadas por MNT (Kontos *et al.*, 2015; Schön & Chrysanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015).

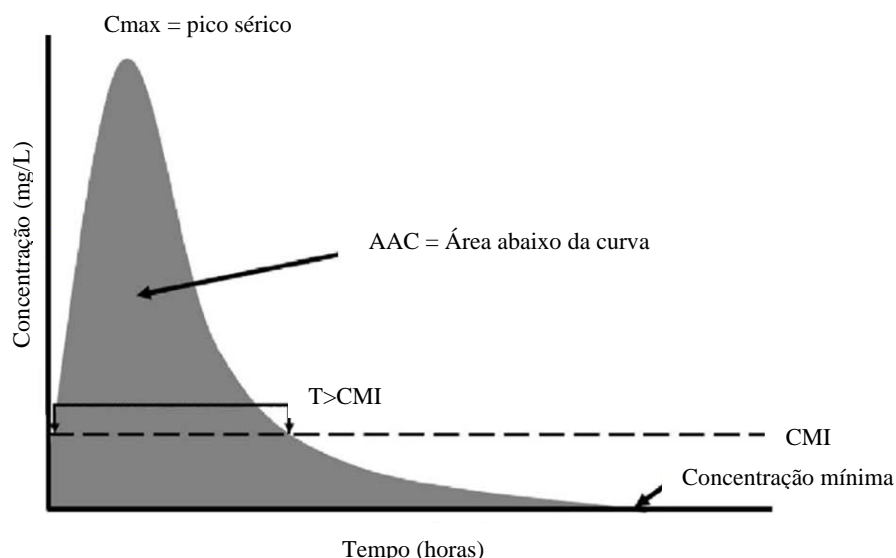


Figura 1.7 – Parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica relacionados com a evolução clínica (obtido e adaptado de: Roberts & Lipman, 2009).

1.8 – Objetivos

O objetivo primário do presente trabalho consiste na caracterização da estrutura populacional e níveis de resistência de isolados clínicos de microrganismos pertencentes ao MAC em Portugal, nomeadamente o *M. avium* e *M. intracellulare*. Os objetivos específicos consistem na:

1. Identificação molecular de isolados clínicos de *M. avium* ao nível de subespécie e caracterização da distribuição de regiões genómicas específicas para cada subespécie;
2. Pesquisa de isolados de *M. chimaera* entre isolados clínicos previamente identificados como *M. intracellulare* e desenvolvimento de método rápido de deteção;
3. Quantificação dos níveis de resistência fenotípicos a diversos antibióticos utilizados no tratamento de micobacterioses e eventual correlação com a (sub)espécie de MNT;
4. Caracterização da diversidade genética e estrutura populacional dos isolados clínicos de *M. avium* com recurso a VNTRs;
5. Identificação de conjuntos restritos de *loci* com elevado poder discriminatório para tipagem rápida de *M. avium*.

1.9 – Estratégia experimental

Tendo como objectivo primário uma melhor compreensão dos determinantes genéticos e suscetibilidade fenotípica a diversos antibióticos, o presente estudo compreende uma caracterização molecular de diversos isolados clínicos de *M. avium* e *M. intracellulare* isolados em Portugal na Região de Lisboa ao longo de oito anos. Trata-se de uma abordagem molecular e fenotípica em que uma primeira fase visa confirmar a identificação laboratorial e proceder à identificação laboratorial ao nível da subespécie em que para tal serão pesquisadas várias regiões genómicas específicas e examinada a sua distribuição pelos diferentes isolados (Álvarez *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2010). Também para diferenciar e comparar os isolados clínicos de *M. avium* isolados em Portugal, recorrer-se-á à amplificação por PCR e análise de *loci* MIRU-VNTR (Thibault *et al.*, 2007). Os *loci* utilizados serão os seguintes: MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 47, VNTR 3, VNTR 7, VNTR 10 e VNTR 32 (Thibault *et al.*, 2007). No entanto, devido ao seu poder discriminatório limitado, em parte derivado de se tratar de um conjunto limitado a apenas oito *loci* proceder-se-á ainda à amplificação de alguns *loci* MATR (Inagaki *et al.*, 2009).

No que concerne à quantificação dos níveis de resistência, será determinada a CMI para seis antibióticos utilizados no tratamento de micobacterioses: claritromicina, rifabutina, etambutol, moxifloxacina, rifampicina e amicacina. O método a utilizar para a determinação das CMIs será por microdiluição em placa, testando o crescimento em nove concentrações distintas. As CMIs obtidas serão posteriormente avaliadas relativamente a pontos de corte propostos, permitindo a classificação de cada isolado em resistente, intermédio ou sensível para cada antibiótico testado, bem como serão comparadas as CMIs relativamente aos picos séricos já descritos para cada fármaco (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015).

2.1 - Isolados clínicos e extração de DNA

A amostra de estudo incluiu um total de 46 isolados clínicos de *M. avium* (n=22) e *M. intracellulare* (n=24), provenientes dos hospitais A, B, C e D. Dos isolados aqui estudados, 43 foram isolados e inicialmente identificados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) e três foram isolados e inicialmente identificados no laboratório GeneralLab, tendo sido enviados posteriormente à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para caracterização molecular e microbiológica adicional. Tratando-se de um estudo retrospectivo, os isolados clínicos aqui estudados e incluídos na amostra foram isolados e identificados entre 2009-2018.

A cultura e manipulação dos isolados clínicos foi realizado no Laboratório de Biossegurança de Nível 3 da FFUL/iMed.Ulisboa. Todos os isolados foram sub-cultivados em meio Lowenstein-Jensen (LJ; Becton-Dickinson) e a extração de DNA realizada de acordo com o método de van Soolingen *et al* (2009) para obtenção de DNA de elevado peso molecular. Para este efeito, após o crescimento dos isolados, procedeu-se à inativação da cultura, sendo as colónias transferidas para um tubo contendo 400 µL de tampão TE 1X e incubadas a 80 °C durante 20 min. De seguida, para desnaturar a parede celular e consequentemente lisar as células para libertar o conteúdo intracelular, foi adicionada lisozima a cada tubo numa concentração final de 1 mg/mL seguida da incubação com agitação a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, com a finalidade de degradar todas as proteínas em suspensão, foi adicionado a cada tubo 75 µL da mix Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10 %/proteínase K (5 µL proteínase K a 10 mg/mL + 70 µL de SDS 10 %) seguida de incubação de 10 min a 65 °C. Posteriormente foi adicionado 100 µL de NaCl 5 M seguida da adição 100 µL da mistura de Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetil-amónio (CTAB) e NaCl. Os tubos foram agitados no vórtex até a suspensão ficar leitosa e foram incubados por 10 minutos a 65 °C. Foram adicionados a cada tubo 750 µL de clorofórmio álcool-isoamílico (24: 1) e os tubos foram agitados no vórtex e depois centrifugados em uma microcentrífuga a 12.000 g por 5 min a temperatura ambiente. O DNA genómico presente na fase aquosa resultante foi transferido para um novo microtubo e precipitado através da adição de 450 µL de isopropanol, sendo posteriormente sujeito a uma série de centrifugações (van Soolingen *et al.*, 2009). Os *pellets* resultantes contendo o DNA micobacteriano foram ressuspensos em 50 ou 80 µL de tampão TE 1x, dependendo da quantidade de DNA precipitado observado aquando da precipitação em isopropanol. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria em um aparelho NanoDrop ND-1000 a 260 nm e a 280 nm, tendo-se em seguida realizado diluições em água Milli-Q para uma concentração final de trabalho de 25 ng/µL. As soluções de DNA, stock e de trabalho, foram armazenadas a -20 °C tendo as soluções a 25 ng/µL sido utilizadas nos métodos de biologia molecular subsequentes.

2.2 – Identificação molecular dos isolados clínicos

Para identificar os isolados de *M. avium* ao nível da subespécie e confirmar a identificação dos isolados de *M. intracellulare* recorreu-se à amplificação, por PCR, de alguns *loci* específicos: IS1311, IS901, DT1 (Shin *et al.*, 2010) e IS1245 (Álvarez *et al.*, 2008; Guerreo *et al.*, 1995). As reações de amplificação da IS1311, da IS901 e do DT1 foram realizadas conforme descrito previamente por Shin *et al* (2010), sendo, no entanto, otimizadas neste estudo com a seguinte composição: 0,4 µM de cada primer. 0,2 mM de dNTPs NZYMix, 2,5 µL de tampão de reação 10x (Nzytech), 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 4 U de NZYTaq DNA polymerase, 3 mM de MgCl₂ (Nzytech), 2 µL de DNA (25 ng/µL) e água Milli-Q até perfazer um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram otimizadas para cada alvo tendo como objetivo a obtenção de uma única banda específica, tendo as reações de amplificação sido realizadas num termociclador T1 (Biometra).

As condições de amplificação para a *IS901* consistiram em um ciclo de 5 min a 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 95 °C; 40 s a 58°C e 1 min e 30 s a 72 °C; um ciclo de extensão de 10 min a 72 °C. Para a *IS1311* as condições de amplificação foram iguais às usadas para a *IS901* com exceção da temperatura de *annealing* de 62,5 °C. Para o marcador DT1 as condições de amplificação incluíram uma temperatura de *annealing* de 62,5 °C durante 40 s e a uma temperatura de extensão de 72 °C durante 30 s. Para a amplificação da *IS1245*, a composição das reações de amplificação foi igual às reações de PCR para os *loci* mencionados anteriormente, com exceção do MgCl₂ que foi utilizado a uma concentração final de 1,5 mM de acordo com Guerrero *et al* (1995). As condições de amplificação para a *IS1245* foram igualmente adaptadas de Guerrero *et al* (1995): um ciclo de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 66 °C e 30 s a 72 °C; um ciclo de extensão de 10 min a 72 °C (Guerrero *et al.*, 1995). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se listados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos *loci* usados na identificação dos isolados.

<i>Locus</i>	<i>Primer</i>	Sequências dos <i>Primers</i> (5'-3')	Referência
<i>IS901</i>	IS901-F	GAACGCTGCTCTAAGGACCTGTTGG	Shin <i>et al.</i> , 2010
	IS901-R	GGAAGGGTGATTATCTGGCCTGC	
<i>IS1311</i>	IS1311-F	GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA	Shin <i>et al.</i> , 2010
	IS1311-R	ATGACGACCGCTTGGGAGAC	
<i>IS1245</i>	IS1245-F	GCCGCCGAAACGATCTAC	Álvarez <i>et al.</i> , 2008
	IS1245-R	AGGTGGCGTCGAGGAAGA	
DT1	DT1-F	CGTTGGCTGGCCATTCACGAAGGAGT	Shin <i>et al.</i> , 2010
	DT1-R	GCTAGTTGGATCGCGCCGAACACCGG	
SR1	SR1-F	TTGTACACACCGCCCGTC	Este trabalho
	SR1-R	TCTCGATGCCAAGGCATC	
ITS	ITS-F	TTGTACACACCGCCCGTC	Lecorche <i>et al.</i> , 2018
	ITS-R	TCTCGATGCCAAGGCATC	
<i>hsp65</i>	<i>hsp65</i> -F	ATCGCCAAGGAGATCGAGCT	Lecorche <i>et al.</i> , 2018
	<i>hsp65</i> -R	AAGGTGCCGCGGATCTTGTT	

2.3 –Identificação molecular de *M. chimaera*: amplificação do gene SR1

Para confirmar a identificação dos isolados de *M. intracellulare* e discriminar da espécie *M. chimaera*, além da amplificação dos *loci* referidos anteriormente (ponto 2.2), recorreu-se também à amplificação do gene SR1 recentemente descrito como específico de *M. chimaera* (Zozaya-valdés *et al.*, 2017). Os *primers* utilizados foram desenhados com recurso à ferramenta Oligo Explorer. Cada reação de amplificação foi composta por 0,4 µM de cada *primer* (Tabela 2.1), 0,2 mM de dNTPs NZYMix, 2,5 µL de tampão de reação 10x (Nzytech), 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 4 U de NZYTaq DNA polymerase, 2 mM de MgCl₂ (Nzytech), 2 µL de DNA (25 ng/µL) e água Milli-Q até perfazer um volume final de 25 µL. As condições de amplificação consistiram em um ciclo de 5 min a 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 95 °C; 1 min a 61 °C e 1 min a 72 °C; um ciclo de extensão de 10 min a 72 °C (Zozaya-valdés *et al.*, 2017).

2.4 – Amplificação, purificação e sequenciação do gene *hsp65* e do locus ITS

A amplificação do *locus* ITS e do gene *hsp65* foi realizado conforme descrito por Lecorche *et al* (2018).

Para a amplificação do *locus* ITS, cada reação de PCR foi composta por 4 U de NZYTaq DNA polymerase, 0,4 µM de cada *primer* (Tabela 2.1), 0,2mM µL de dNTPs NZYMix, 2,5 µL de tampão de reação 10x (Nzytech), 2 mM de MgCl₂ (Nzytech), 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 2 µL de DNA (25 ng/µL) e água Milli-Q até perfazer um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram

as seguintes: um ciclo de 5 min a 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 58 °C e 1 min a 72 °C; e um ciclo de 10 min a 72 °C (Lecorche *et al.*, 2018).

Para a amplificação do gene *hsp65*, cada reação de PCR foi composta por 4 U de NZYTaQ DNA polymerase, 0,4 µM de cada *primer* (Tabela 2.1), 0,2mM µL de dNTPs NZYMix, 2,5 µL de tampão de reação 10x (Nzytech), 1,5 mM de MgCl₂ (Nzytech), 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 2 µL de DNA (25 ng/µL) e água Milli-Q até perfazer um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de 5 min a 95 °C; 45 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 56 °C e 1 min a 72 °C; e um ciclo de 10 min a 72 °C (Lecorche *et al.*, 2018).

Os produtos de PCR obtidos foram purificados usando o kit NZYGelpure (NZYtech, Lisboa, Portugal) e os produtos de amplificação enviados para sequencição de Sanger através de um fornecedor externo de serviços (STAB VIDA). A identificação de sequências homólogas às obtidas e distribuição por espécie foi realizada com recurso ao programa BLAST (blastn, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra toda a coleção nucleotídica disponível.

2.5- Suscetibilidade a antimicrobianos: determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Através do método adaptado da proposta para determinação das CMIs em *M. tuberculosis* pelo EUCAST (Reference protocol for MIC determination of anti-tuberculous agents against isolates of the Mycobacterium tuberculosis complex in Middlebrook 7H9 broth; acedido em http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Mycobacteria/Methods_in_AMST/Technical_protocol_AMST_MIC_reference_method_190719.pdf, a 13 de Junho de 2019 às 11h00), foram realizados antibiogramas para a claritromicina, rifabutina, etambutol, moxifloxacina, rifampicina e ampicacina (SIGMA-ALDRICH) através de microdiluição em meio Middlebrook 7H9 suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC) e o respetivo antibiótico num volume final de 200 µL por poço. Para cada isolado foi usada uma placa de 96 poços, sendo os seis antibióticos distribuídos pelas linhas B-G (Figura 2.1) e diluídos numa proporção de 1:2 ao longo das colunas 3-11 com concentrações finais variáveis consoante o antibiótico. Para tal, foram adicionados 100 µL de meio Middlebrook 7H9-OADC a todos os poços das linhas B-G, excetuando as colunas 3 e 12. Na coluna 3 foram adicionados 200 µL de meio Middlebrook 7H9-OADC contendo antibiótico ao dobro da concentração mais alta pretendida, tendo-se em seguida realizado em cada linha, com recurso a uma pipeta multicanal, diluições seriadas (1:2) ao longo das colunas 4-11 através da pipetagem de 100 µL da coluna 3 para a coluna 4 e assim sucessivamente. Cada poço compreendido entre as colunas 3-11 e linhas B-G foi inoculado com 100 µL de suspensão bacteriana, obtida por ajuste à escala de MacFarland 0,5 e diluída 1:100 em meio de Middlebrook 7H9-OADC. Os controlos negativos (200 µL de meio Middlebrook 7H9-OADC) foram adicionados nos poços da primeira coluna (coluna 1) com exceção do primeiro e do último. Os controlos positivos (meio Middlebrook 7H9-OADC sem antibiótico) foram adicionados na segunda coluna (coluna 2) em triplicado (linhas B-D) através da adição de 100 µL da suspensão bacteriana. Um segundo controlo positivo, também em triplicado, foi realizado através da inoculação de 100 µL de uma diluição 1:100 (1 %) da suspensão bacteriana utilizada nos restantes poços. Para minimizar a evaporação da amostra, adicionou-se 200 µL de água estéril aos poços da primeira e última linha e, aos poços da última coluna. As placas foram incubadas a 37 °C e examinadas ao microscópio ótico invertido ao 10º e 14º dia após a incubação (Schön & Chryssanthou, 2017).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril
B	C-	C+ 100 %	CLA 64	CLA 32	CLA 16	CLA 8	CLA 4	CLA 2	CLA 1	CLA 0,5	CLA 0,25	H ₂ O estéril
C	C-	C+ 100 %	RIB 16	RIB 8	RIB 4	RIB 2	RIB 1	RIB 0,5	RIB 0,25	RIB 0,125	RIB 0,063	H ₂ O estéril
D	C-	C+100 %	EMB 64	EMB 32	EMB 16	EMB 8	EMB 4	EMB 2	EMB 1	EMB 0,5	EMB 0,25	H ₂ O estéril
E	C-	C+ 1 %	MXF 32	MXF 16	MXF 8	MXF 4	MXF 2	MXF 1	MXF 0,5	MXF 0,25	MXF 0,125	H ₂ O estéril
F	C-	C+ 1 %	RIF 32	RIF 16	RIF 8	RIF 4	RIF 2	RIF 1	RIF 0,5	RIF 0,25	RIF 0,125	H ₂ O estéril
G	C-	C+ 1 %	AMK 64	AMK 32	AMK 16	AMK 8	AMK 4	AMK 2	AMK 1	AMK 0,5	AMK 0,25	H ₂ O estéril
H	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril	H ₂ O estéril

Figura 2.1 – Ilustração das placas de 96 poços utilizadas na realização dos testes de suscetibilidade (CLA- claritromicina; RIB- rifabutina; EMB- etambutol; MXF- moxifloxacina; RIF- rifampicina; AMK- amicacina). A concentração (µg/mL) de cada antibiótico em cada poço encontra-se representada à frente da respetiva abreviatura do antibiótico. O C+ 100 % e o C+ 1 % correspondem ao controlo positivo obtido através da inoculação de 100 µL da suspensão bacteriana e ao controlo positivo obtido através da inoculação de 100 µL de uma diluição 1:100 (1 %) da suspensão bacteriana, respetivamente.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada a partir da concentração mais baixa para a qual não se verificou crescimento. Para os isolados cujo controlo positivo diluído 1:100 (1 %) cresceu até ao 10º dia considerou-se o valor da CMI registada nesse mesmo dia. Para os isolados cujo controlo positivo diluído 1:100 (1 %) não cresceu até ao 10º dia considerou-se o valor da CMI registada ao 14º dia. Os pontos de corte para a classificação fenotípica enquanto resistente, intermédio ou sensível encontram-se descritos na Tabela 2.2 (Brown-Elliott *et al.*, 2013; van Ingen *et al.*, 2012; Mok *et al.*, 2019), tendo-se também determinado a CMI₅₀ e a CMI₉₀ para cada antibiótico. A CMI₅₀ e a CMI₉₀ são definidas como a concentração mínima necessária para inibir o crescimento visível de pelo menos 50 % e 90 % dos isolados, respetivamente (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017), tendo sido determinadas através da análise da distribuição das CMIs para cada antibiótico (Figura 3.4 do capítulo 3).

Tabela 2.2 – Pontes de corte sugeridos para a classificação fenotípica dos isolados enquanto resistentes, intermédios ou sensíveis.

Antibióticos	Sensível	Intermédio	Resistente	Referência
Claritromicina (µg/ml)	≤8	16	≥32	Mok <i>et al.</i> , 2019
Rifabutina (µg/ml)	≤0,12	0,25	≥0,5	van Ingen <i>et al.</i> , 2012
Etambutol (µg/ml)	≤2	4	≥8	Mok <i>et al.</i> , 2019
Moxifloxacina (µg/ml)	≤1	2	≥4	Mok <i>et al.</i> , 2019
Rifampicina (µg/ml)	≤0.5	2	≥8	Mok <i>et al.</i> , 2019; van Ingen <i>et al.</i> , 2012
Amicacina (µg/ml)	≤16	32	≥64	Brown-Elliott <i>et al.</i> , 2013

2.6 – Genotipagem de isolados clínicos de *M. avium*: MIRU-VNTR

Para comparar e agrupar os isolados de *M. avium*, recorreu-se à amplificação de oito *loci* sendo eles: MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 47, VNTR 3, VNTR 7, VNTR 10 e VNTR 32 (Eisenberg *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007; http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php?p=fa_nomenclature, acessado a 15 de Novembro de 2018 às 11h45). A composição das reações de amplificação, as condições de amplificação e a sequência dos *primers* utilizados foram obtidas no site INMV Database (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php>, acessado a 15 de Novembro de 2018 às 12h00), tendo a composição das reações de amplificação e algumas temperaturas de *annealing* sido adaptadas devido à dificuldade em obter amplificação.

A composição das reações de amplificação foi muito semelhante nos diferentes *loci*, apresentando apenas diferenças na quantidade de MgCl₂ e na adição de betaína num dos *loci*. Assim, cada reação de amplificação foi composta por 0,4 µM de cada primer 0,2 mM de dNTPs NZYMix, 2,5 µL de tampão de reação 10x (Nzytech), 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 4 U de NZYTaq DNA polymerase, 2 mM de MgCl₂ (Nzytech) para os *loci* MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 3, VNTR 7 e VNTR 32 ou 1,5 mM de MgCl₂ (Nzytech) para os *loci* VNTR 47 e VNTR 10, 2 µL de DNA (25 ng/µL) e água Milli-Q até perfazer um volume final de 25 µL. Nas reações de amplificação do *locus* VNTR 32 foi ainda adicionado 5 µL de Betaína (5M). As condições de amplificação também foram muito semelhantes em todos os *loci* verificando-se apenas diferenças na temperatura de *annealing*. Assim, as condições de amplificação consistiram num passo inicial de 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 1 min, 53-62 °C durante 1 min (temperaturas de *annealing* respetivas a cada *locus* indicadas na Tabela 2.3) e 72 °C durante 1 min, terminando com um passo de extensão final de 72 °C durante 10 min. A sequência dos *primers* utilizados e a temperatura de *annealing* para cada *locus* podem ser observados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Sequência dos *primers* utilizados e temperatura de *annealing* para os oito *loci* VNTR utilizados.

<i>Locus</i> VNTR	<i>Primers</i>		Temperatura de <i>annealing</i>
	<i>Forward</i> (5'-3')	<i>Reverse</i> (5'-3')	
292	CTTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	GCTGTATGAGGAAGTCTATTCATGG	56 °C
X3	AACGAGAGGAAGAACTAAGCCG	TTACGGAGCAGGAAGGCCAGCGGG	57 °C
25	GTCAAGGGATCGGCGAGG	TGGACTTGAGCACGGTCAT	56 °C
47	CGTTGCGATTCTGCGTAGC	GGTGATGGTCGTGGTCATCC	64,5 °C
3	CATATCTGGCATGGCTCCAG	ATCGTGTTGACCCCAAAGAAAT	58 °C
7	GACAACGAAACCTACCTCGTC	GTGAGCTGGCGGCCTAAC	58 °C
10	GACGAGCAGCTGTCCGAG	GAGAGCGTGGCCATCGAG	61,5 °C
32	CCACAGGGTTTTTGGTGAAG	GGAAATCCAACAGCAAGGAC	53 °C

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (p/v) (Thibault *et al.*, 2007) em tampão borato de sódio 1x, utilizando o marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder VI. Amostras representativas de cada banda obtida numa mesma eletroforese foram posteriormente, sujeitas a eletroforese em gel de agarose a 3 % (p/v) para melhor resolução das bandas visualizadas e identificação alélica (Tabela 2.4) tal como descrito por Inagaki *et al* (2009), Pate *et al* (2011), Radomski *et al* (2010), Rindi *et al* (2013) e Thibault *et al* (2007).

Tabela 2.4 – Número de repetições com base no tamanho dos amplicões para os oito *loci* *MIRU-VNTR* em *M. avium* (obtido e adaptado de: http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php?p=fa_nomenclature, no dia 12 de dezembro de 2018 às 15h15).

Número de repetições	<i>MIRU-VNTR</i>							
	292	X3	25	47	3	7	10	32
0	141	94	176	112	154	159	193	154
1	194	147	234	147	181	181	248	172
2	247	200	292	182	208	203	303	190
3	300	253	350	217	235	225	358	208
4	353	306	408	252	262	247	413	226
5	406	359	466	287	289	269	468	244
6	459	412	524	322	316	291	523	262
7	512	465	582	357	343	313	578	280
8	565	518	640	392	370	335	633	298
9	618	571	698	427	397	357	688	316
10	671	624	756	462	424	379	743	334
11	724	677	814	497	451	401	798	352
12	777	730	872	532	478	423	853	370

2.7 – Genotipagem de isolados clínicos de *M. avium*: *MATR-VNTR*

Para se poder obter o maior poder discriminatório possível, foram ainda realizadas amplificações dos seguintes *loci* *MATR-VNTR*: MATR-1; MATR-4; MATR-5; MATR-6; MATR-7; MATR-8; MATR-11; MATR-12; MATR-13; MATR-14; MATR-15; MATR-16. Os *loci* MATR-2, MATR-3, MATR-9, MATR-10 não foram usados visto que os *primers* desses *loci* possuem sequências alvo iguais aos *primers* TR usados no método dos *MIRUs* (Ex: os *primers* do locus MATR-3 têm o mesmo alvo que os *primers* do locus TR X3) (Inagaki *et al.*, 2009).

Para cada *locus*, cada reação de amplificação foi composta por 0,4 µM de cada *primer* (Tabela 2.5), 0,2 mM de dNTPs NZYMix, 2,5 µL de tampão de reação 10x (Nzytech), 1 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 4 U de NZYTaq DNA polymerase, 1,5 mM de MgCl₂ (Nzytech), 2 µL de DNA (25 ng/µL) e água Milli-Q até perfazer um volume final de 25 µL. As condições de amplificação consistiram num ciclo inicial de 5 min a 95 °C; 38 ciclos de 30 s a 95 °C; 30 s a 68 °C e 1 min a 72 °C; um ciclo de extensão de 7 min a 72 °C (Inagaki *et al.*, 2009).

Tabela 2.5 – Sequência dos *primers* utilizados na amplificação de 12 *loci* *MATR-VNTR* (Inagaki *et al.*, 2009).

<i>Locus</i> <i>VNTR</i>	<i>Primers</i>	
	<i>Forward</i> (5'-3')	<i>Reverse</i> (5'-3')
MATR-1	GAACGTTGGGCGCAATGCGA	GTGTTCGGACCCCTCCCGTAA
MATR-4	GACAATGGCATGCCGATCCT	CGCTACGGCCTTCTCCATCT
MATR-5	CTTGACAGCAGGACGATCAGG	GTGGTCGAAGTCGCTGTGG
MATR-6	TCGCAGGAAACCAACCTCAA	GCGTGATCGACTCGAAGACC
MATR-7	CCGAGGAAGAGACGAAACCC	TCGTCACCCACAACATGCAG
MATR-8	CAGGTCCAGGGCATGTTTCC	TCCCATAATCCGTTGCATGAC
MATR-11	TGGCTGCTGTTCAATTGGATG	TCGTCGGTCAATTGCACCTT
MATR-12	TGATGGCGACCAACGACAAGG	TGGATGCGGCCGACCAACA
MATR-13	CCTCGAAGGTGGCGGACTTG	ACCAGGATGGTGCCCAAACC
MATR-14	TGGTCGCCGCACACCTACT	GCCCTTACTGGGCAGGTCCTTC
MATR-15	GGAAGGCAGCAAGGGTCAAC	TCAGGTCCAGCGACAGCTTC
MATR-16	GTGGTCAGCACCCGAGAGT	ACCACCGACTGCTCGACCTT

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (p/v) em tampão borato de sódio 1x, utilizando o marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder VI. Amostras representativas de cada banda obtida numa mesma eletroforese foram posteriormente sujeitas a eletroforese em gel de agarose a 2 % (p/v) para melhor resolução das bandas visualizadas e identificação alélica (Tabela 2.6) tal como descrito na literatura (Inagaki *et al.*, 2009).

Tabela 2.6 – Número de repetições com base no tamanho dos amplicões para os *loci* *MATR* (Inagaki *et al.*, 2009).

Número de repetições	<i>Locus MATR</i>											
	1	4	5	6	7	8	11	12	13	14	15	16
0	230	168	133	210	220	106	284	371	233	215	194	241
1	282	221	191	268	277	163	339	428	290	273	251	300
2	334	274	249	326	334	220	394	485	347	331	308	359
3	386	327	307	384	391	277	449	542	404	389	365	418
4	438	380	365	442	448	334	504	599	461	447	422	477
5	490	433	423	500	505	391	559	656	518	505	479	536
6	542	486	481	558	562	448	614	713	575	563	536	595
7	594	539	539	616	619	505	669	770	632	621	593	654
8	646	592	597	674	676	562	724	827	589	679	650	713
9	698	645	655	732	733	619	779	884	746	737	707	772
10	750	698	713	790	790	676	834	941	803	795	764	831

2.8 – Análise filogenética, *clustering* hierárquico e diversidade alélica

A análise filogenética baseada na sequência nucleotídica dos *loci* ITS e *hsp65* teve como ponto de partida o alinhamento das sequências obtidas para os isolados selecionados e respectivos homólogos das estirpes *M. avium* ATCC25291 e 104. O alinhamento foi realizado através do programa CLC Sequence Viewer v7.6.1 (CLC bio®, Aarhus N, Dinamarca) e visualizado no BioEdit v7.1.3.0 (T. Hall). O melhor modelo de substituição nucleotídica foi selecionado através do ajuste de vários modelos e permutações compreendendo a inclusão dos parâmetros proporção de posições invariáveis (I) e taxa variável de substituição por local (G) utilizando o programa jModelTest. Para ambos os *loci*, foi selecionado o modelo GTR (Gouy *et al.*, 2010). A árvore filogenética foi contruída utilizando o método da máxima verossimilhança implementado no software Seaview. Foi ainda utilizada a ferramenta iTOL: Interactive Tree Of Life disponível online em <https://itol.embl.de/>, para anotação e visualização da árvore filogenética.

Dendrogramas baseados em *loci* *MIRU-VNTR* e/ou *MATR-VNTR* foram construídos através da ferramenta online *MIRU-VNTRplus* para *M. tuberculosis*, usando o método categórico para cálculo de distâncias genéticas e o método de agrupamento de pares não ponderados com médias aritméticas (UPGMA) (Weniger *et al.*, 2010). Tratam-se de diagramas que organizam os organismos com base nas semelhanças ou diferenças entre si, tendo-se definido um *cluster* como um grupo de dois ou mais isolados com perfil genotípico idêntico (Morrison, 1996).

A diversidade alélica (*h*) foi calculada de acordo com Selander *et al* (1986) usando a seguinte fórmula: $h = 1 - \sum x_i^2 [\frac{N}{N-1}]$, onde N é o número total de estirpes não relacionadas epidemiologicamente e x_i é a frequência do alelo i no *locus* (Pate *et al.*, 2011). O poder discriminatório do método foi calculado através da equação descrita por Hunter e Gaston (HGDI): $DI = 1 - [\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj - 1)]$, onde N é o número total de estirpes na população, s é o número total de padrões distintos determinados pelo método de tipagem e o nj é o número de estirpes pertencentes ao j-ésimo padrão (Douarre, *et al.*, 2011; Hunter PR & Gaston MA, 1988; Mokrousov, 2017).

3.1 – Caracterização da amostra e relevância epidemiológica de *M. avium* e *M. intracellulare*

Todos os 46 isolados clínicos incluídos neste estudo foram previamente obtidos através de diferentes amostras biológicas de diversos doentes distribuídos pelos hospitais A, B, C e D, tendo os isolados sido identificados posteriormente. Esta identificação inicial permitiu classificar 22 isolados como *M. avium* e 24 isolados como *M. intracellulare* (Tabela 3.1). Para os isolados MA5, MI12 e MI14 não foi possível obter informações acerca da origem destes isolados.

Para este estudo, os hospitais A e C foram os hospitais que contribuíram com a maior percentagem de isolados, com cerca de 41,3 % (19/46) e 32,6 % (15/46) dos isolados, respetivamente, a serem provenientes destes dois hospitais. O hospital B contribuiu com cerca de 15,2 % (7/46) dos isolados e o hospital D com cerca de 4,3 % (2/46) dos isolados. Houve ainda três isolados (cerca de 6,7 % da amostra) com proveniência hospitalar desconhecida.

Dos 19 isolados provenientes do hospital A, 10 foram identificados como *M. avium* e nove foram identificados como *M. intracellulare*. O hospital C foi o hospital com a maior percentagem de isolados de *M. intracellulare*, uma vez que dos 15 isolados, 11 foram identificados como *M. intracellulare* e quatro foram identificados como *M. avium*. Em relação ao hospital B, quatro isolados foram identificados como *M. avium* e três isolados foram identificados como *M. intracellulare*. Os dois isolados do hospital D foram identificados como *M. avium* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Caracterização dos isolados clínicos e respetiva distribuição.

Isolado	Ano	Identificação Reportada	Hospital	Amostra biológica
MA3	2014	<i>M. avium</i>	A	Sangue
MA4	2015	<i>M. avium</i>	A	Secreções brônquicas
MA5	2017	<i>M. avium</i>	NI	NI
MA6	2009	<i>M. avium</i>	A	Expetoração
MA7	2011	<i>M. avium</i>	B	Expetoração
MA8	2014	<i>M. avium</i>	C	Pus
MA9	2015	<i>M. avium</i>	A	Sangue
MA10	2009	<i>M. avium</i>	D	Secreções brônquicas
MA11	2009	<i>M. avium</i>	D	Lavado broncoalveolar
MA12	2014	<i>M. avium</i>	A	Expetoração
MA13	2011	<i>M. avium</i>	A	Secreções brônquicas
MA14	2018	<i>M. avium</i>	A	Secreções brônquicas
MA15	2017	<i>M. avium</i>	A	Expetoração
MA16	2014	<i>M. avium</i>	C	Lavado broncoalveolar
MA17	2018	<i>M. avium</i>	B	Secreções brônquicas
MA18	2018	<i>M. avium</i>	A	Secreções brônquicas
MA19	2016	<i>M. avium</i>	C	NI
MA20	2016	<i>M. avium</i>	B	Secreções brônquicas
MA21	2017	<i>M. avium</i>	C	Secreções brônquicas
MA22	2017	<i>M. avium</i>	A	NI
MA23	2014	<i>M. avium</i>	B	Expetoração
MA24	2009	<i>M. avium</i>	A	Secreções brônquicas
MI1	2016	<i>M. intracellulare</i>	C	Lavado broncoalveolar
MI2	2016	<i>M. intracellulare</i>	A	Secreções brônquicas
MI3	2016	<i>M. intracellulare</i>	C	Lavado broncoalveolar

Tabela 3.1 – Continuação.

MI4	2016	<i>M. intracellulare</i>	A	Secreções brônquicas
MI5	2016	<i>M. intracellulare</i>	C	Secreções brônquicas
MI6	2016	<i>M. intracellulare</i>	C	NI
MI7	2017	<i>M. intracellulare</i>	B	Lavado broncoalveolar
MI8	2012	<i>M. intracellulare</i>	A	Secreções brônquicas
MI9	2012	<i>M. intracellulare</i>	C	Expetoração
MI11	2011	<i>M. intracellulare</i>	A	Expetoração
MI12	2017	<i>M. intracellulare</i>	NI	NI
MI13	2011	<i>M. intracellulare</i>	A	Expetoração
MI14	2017	<i>M. intracellulare</i>	NI	NI
MI15	2014	<i>M. intracellulare</i>	C	Expetoração
MI16	2015	<i>M. intracellulare</i>	C	Secreções brônquicas
MI17	2010	<i>M. intracellulare</i>	A	Aspiração traqueal
MI18	2015	<i>M. intracellulare</i>	B	Expetoração
MI19	2009	<i>M. intracellulare</i>	A	Secreções brônquicas
MI20	2015	<i>M. intracellulare</i>	C	Secreções brônquicas
MI21	2014	<i>M. intracellulare</i>	C	Expetoração
MI22	2012	<i>M. intracellulare</i>	B	Expetoração
MI23	2014	<i>M. intracellulare</i>	A	Secreções brônquicas
MI24	2014	<i>M. intracellulare</i>	C	Expetoração
MI25	2014	<i>M. intracellulare</i>	C	Secreções brônquicas

*NI – não há informações

3.2 – Identificação dos isolados clínicos

A confirmação da identificação reportada dos isolados clínicos foi realizada através da amplificação, por PCR, de quatro *loci* específicos, cuja presença/ausência no genoma pode ser usado para comparação e identificação ao nível da (sub)espécie. Os *loci* utilizados neste estudo foram a IS1311, a IS901, o DT1 (Shin *et al.*, 2010) e a IS1245 (Álvarez *et al.*, 2008; Guerreo *et al.*, 1995) e, em termos práticos, a amplificação destes *loci* gera perfis que possibilitam inferir qual a espécie ou subespécie dos isolados (Tabela 1.2 do capítulo 1). As estirpes *M. avium* ATCC25291 e 104 (*M. avium* subsp. *avium* (serotipo 2) e *M. avium* subsp. *hominissuis*, respetivamente) foram usadas como controlos positivos sendo os seus perfis comparados com os dos restantes isolados.

Assim, por comparação com os controlos positivos e de acordo com a Tabela 1.2, todos os isolados para os quais houve apenas amplificação dos *loci* IS1245 e IS1311 foram classificados como *M. avium* subsp. *hominissuis* e todos os isolados para os quais houve apenas amplificação do *locus* DT1 foram classificados como *M. intracellulare*. O isolado MA13 apenas não amplificou o DT1 sendo por isso classificado como *M. avium* subsp. *avium*. Assim, com exceção da estirpe *M. avium* ATCC25291 (controlo positivo para *M. avium* subsp. *avium*), que amplificou todos os *loci* e do isolado MA13 que apenas não amplificou o DT1, mais nenhum isolado foi classificado como *M. avium* subsp. *avium* (Tabela 3.2). As diferenças registadas ao nível da amplificação do *locus* DT1 entre a estirpe ATCC25291 e o isolado MA13 encontram-se, provavelmente, relacionados ao nível dos serotipos uma vez que de acordo com Thierry *et al* (1993) a espécie *M. avium* é composta por sete serotipos (1-6 e 8), sendo o DT1 específico dos serotipos 2 e 3 (Thierry *et al.*, 1993).

Tabela 3.2 – Resultados da amplificação dos quatro *loci* testados nos 46 isolados clínicos e nas duas estirpes de referência de *M. avium*.

Isolado	Identificação Reportada	IS901	IS1245	IS1311	DT1	Identificação Presuntiva
<i>M. avium</i> ATCC25291	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	+	+	+	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
<i>M. avium</i> 104	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA3	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA4	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA5	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA6	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA7	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA8	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA9	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA10	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA11	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA12	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA13	<i>M. avium</i>	+	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
MA14	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA15	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA16	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA17	<i>M. avium</i>	+	-	+	-	?
MA18	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA19	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA20	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA21	<i>M. avium</i>	+	+	-	-	?
MA22	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA23	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA24	<i>M. avium</i>	-	+	+	-	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MI1	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI2	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI3	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI4	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI5	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI6	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI7	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI8	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	-	?
MI9	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	?
MI11	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI12	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	+	?
MI13	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	?
MI14	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	+	?
MI15	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI16	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI17	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI18	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI19	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI20	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>

Tabela 3.2 – Continuação.

MI21	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI22	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI23	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI24	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>
MI25	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>

Verificou-se que a maioria (19/22) dos isolados identificados como *M. avium* (MA3-MA24) pertenciam à subespécie *M. avium* subsp. *hominissuis* o que está de acordo com o esperado, uma vez que se trata principal subespécie de *M. avium* que infeta o Homem (Rindi *et al.*, 2018). Os restantes três isolados incluem o isolado MA13, único classificado como *M. avium* subsp. *avium*, e, os isolados MA17 e MA21 que tendo sido inicialmente identificados como *M. avium*, não apresentaram um perfil coincidente com nenhuma das subespécies.

Relativamente aos isolados de *M. intracellulare*, verificou-se a existência de cinco isolados com um perfil não coincidente com a espécie: MI8, MI9, MI12, MI13 e MI14. Os isolados MI9 e MI13 não amplificaram nenhum *locus*; o isolado MI8 apenas amplificou a IS901; e, os isolados MI12 e MI14 amplificaram a IS901 e o DT1.

De uma forma global, os resultados obtidos através da amplificação de *loci* específicos apresentam discordância com a identificação laboratorial inicialmente reportada de sete isolados (cerca de 15 % da amostra), não permitindo, desta forma, proceder à confirmação da identificação ao nível de espécie e/ou subespécie dos mesmos (Tabela 3.2). Tendo a identificação laboratorial inicial sido realizada através de métodos moleculares de hibridação reversa, laboratorialmente validados para diagnóstico laboratorial de micobacterioses, importa perceber as limitações destes métodos no presente contexto de estudo e se o mesmo se encontra localmente adaptado (Huh *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2006). Como se pode verificar nos estudos de Lecorche *et al* (2018) e Russo *et al* (2006), estes testes moleculares possuem algumas limitações uma vez que não foi possível, com recurso a estes testes, identificar corretamente todos os isolados (Lecorche *et al.*, 2018; Russo *et al.*, 2006). De facto, no estudo de Lecorche *et al* (2018), apenas 10 % dos resultados obtidos através do teste GenoType *Mycobacterium* CM foram concordantes com os resultados obtidos através da sequenciação do *locus* ITS, uma vez que este teste não consegue diferenciar algumas espécies de MNT, tendo-se como exemplo a incapacidade de diferenciar *M. chimaera* de *M. intracellulare* (Lecorche *et al.*, 2018). Assim, isolados da espécie *M. chimaera*, outra espécie de MNT pertencente ao mesmo complexo de *M. avium* e *M. intracellulare* (MAC), são, frequentemente, erroneamente identificados como *M. intracellulare* (Zozaya-valdés *et al.*, 2017).

3.3 - Identificação dos isolados de *M. chimaera*

Com a finalidade de discriminar as espécies *M. intracellulare* e *M. chimaera* em isolados inicialmente identificados como *M. intracellulare*, procurou-se de seguida discriminar e avaliar a prevalência de *M. chimaera* na amostra estudada através da amplificação do gene SR1. O gene SR1 encontra-se exclusivamente presente em *M. chimaera* podendo por isso ser usado para distinguir esta espécie de outras espécies de MNT (Zozaya-valdés *et al.*, 2017).

No presente trabalho, procurou-se desenvolver um PCR específico e rápido para a deteção do gene SR1 tendo sido desenhados primers específicos para este gene e, em seguida, otimizadas as condições de amplificação. Em nove dos 24 isolados clínicos inicialmente identificados como *M. intracellulare*, foi detetada a presença do gene SR1 (Figura 3.1). Os isolados clínicos positivos para o gene SR1 foram

reclassificados como *M. chimaera*, tendo os restantes mantido a identificação original de *M. intracellulare* (Tabela 3.3).

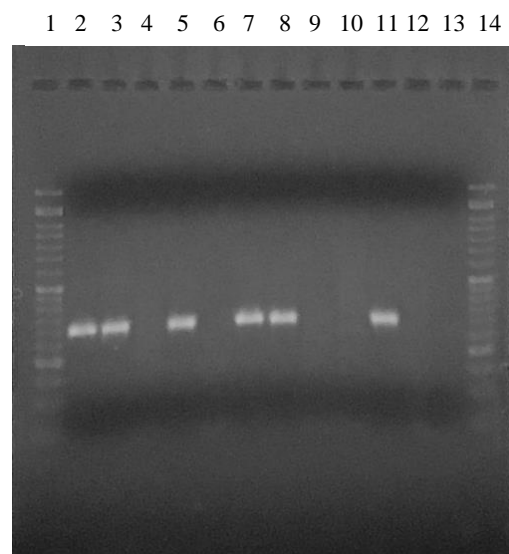


Figura 3.1 – Exemplos de amplificação positiva do gene SR1 em seis isolados clínicos. As faixas 1 e 14 correspondem ao marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder VI. As faixas 2 a 12 correspondem aos isolados MI15, MI16, MI17, MI18, MI19, MI20, MI21, MI22, MI23, MI24, MI25, respetivamente. A faixa 13 corresponde ao controlo negativo. Os amplicões observados na imagem correspondem aos isolados MI15, MI16, MI18, MI20, MI21, MI24, respetivamente. A eletroforese foi realizada num gel de agarose a 1,5 % (p/v) em tampão borato de sódio 1x.

Tabela 3.3 – Amplificação do gene SR1 nos 24 isolados clínicos inicialmente identificados como *M. intracellulare*.

Isolados	Identificação Reportada	IS901	IS1245	IS1311	DT1	SR1	Identificação presuntiva
MI1	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI2	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI3	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI4	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI5	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI6	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI7	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI8	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	-	-	?
MI9	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	?
MI11	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI12	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	+	-	?
MI13	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	?
MI14	<i>M. intracellulare</i>	+	-	-	+	-	?
MI15	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI16	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI17	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI18	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI19	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI20	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI21	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI22	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI23	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>
MI24	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	+	<i>M. chimaera</i>
MI25	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+	-	<i>M. intracellulare</i>

Os resultados assim obtidos revelam limitações dos métodos moleculares comumente utilizados a nível laboratorial no que concerne especificamente a distinção entre as espécies *M. intracellulare* e *M. chimaera*, sendo que este problema poderá ser eventualmente ultrapassado com recurso a novos

testes rápidos como o GenoType NTM-DR da Hain Lifesciences (Figura 1.5) (Huh *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2006). Na presente amostra foram identificados nove isolados incorretamente identificados pelo Genotype, podendo a detecção do gene SR1 desempenhar um papel de relevância na discriminação destas duas espécies (Zozaya-valdés *et al.*, 2017). Assim como *M. intracellulare*, todos os isolados de *M. chimaera* mostraram ser positivos para a amplificação do *locus* DT1. No entanto, nenhum dos isolados reclassificados como *M. chimaera* se encontra entre o conjunto dos cinco isolados com perfil genotípico incompatível com *M. intracellulare*.

Embora os testes de suscetibilidade mostrem que não parece haver uma maior tendência para a aquisição de resistência por parte dos isolados de *M. chimaera* em relação a outras espécies do MAC, uma vez que ambas as espécies apresentam valores de suscetibilidade semelhantes para os antimicrobianos frequentemente utilizados (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015), a diferenciação das espécies *M. chimaera* e *M. intracellulare* continua a ser de extrema importância uma vez que *M. chimaera* tem vindo a ser reportada como causadora de infeções respiratórias em doentes com doença pulmonar prévia, fibrose quística, entre outros (Mok *et al.*, 2019). *M. chimaera* também tem sido reportada como causadora de várias infeções cardiovasculares (van Ingen *et al.*, 2017).

Tem-se verificado uma grande taxa de infeção em ambiente hospitalar, sobretudo durante cirurgias torácicas devido ao uso de água e/ou material hospitalar contaminados. Um exemplo são os *Heater Cooler Units* (usados para aquecer ou resfriar os doentes) que possuem um tanque de água que muitas vezes pode estar contaminada (Becker *et al.*, 2019). Como consequência, após cirurgias cardíacas, tem-se verificado vários casos de infeção disseminada por *M. chimaera* podendo esta estar associada a endocardites e, portanto, causar infeções no coração (Zegri-Reiriz *et al.*, 2018). Verifica-se então que a correta discriminação entre as espécies *M. chimaera* e *M. intracellulare* é de extrema importância, principalmente devido ao atual impacto provocado na saúde pública pela espécie *M. chimaera*. Além disso, deve-se também procurar melhorar as condições de assepsia cirúrgica, assim como estabelecer o tratamento para doentes com endocardite devido a infeção por *M. chimaera* (Zegri-Reiriz *et al.*, 2018).

3.4 – Identificação dos isolados clínicos discordantes: caracterização do *locus* ITS e gene *hsp65*

O *locus* ITS e o gene *hsp65* encontram-se presentes em todas as micobactérias, sendo a sua sequenciação bastante utilizada na identificação ao nível de espécie (Lecorche *et al.*, 2018). De seguida, procurou-se caracterizar a sequência nucleotídica associada a estas regiões nos isolados clínicos de *M. intracellulare* e *M. avium* com perfis de identificação não coincidentes com a espécie ou, cuja identificação requereu testes adicionais (Tabela 3.2). À data de escrita do presente relatório não tinha sido possível incluir o isolado MA17 por ausência de crescimento. As estirpes *M. avium* ATCC25291 e 104 e os isolados MA13 e MA24 foram incluídos como controlos positivos. O isolado MX, pertencente à espécie *M. xenopi* foi incluído para efeitos comparativos e enquanto *outgroup*. O *locus* ITS e o gene *hsp65* foram amplificados com sucesso em todos os isolados testados (Figura 3.2).

Com base na sequenciação do *locus* ITS, e entre os isolados com perfil genético discordante, os resultados sugerem a existência de um isolado da espécie *M. marseillense* (MI8) e a existência de dois isolados da espécie *M. colombiense* (MI9 e MI13). Os resultados obtidos sugerem ainda que o isolado MI11 pertence à espécie *M. avium*. Foi ainda possível confirmar que: os isolados positivos para o gene SR1 pertencem efetivamente à espécie *M. chimaera*; que o isolado MI7 pertence à espécie *M. intracellulare*; e, que o isolado MA21 pertence à espécie *M. avium* não sendo, no entanto, possível confirmar a sua subespécie. Os restantes isolados não puderam ser identificados por meio deste método uma vez que se obteve o mesmo grau de identidade para mais que uma espécie (Tabela 3.4).

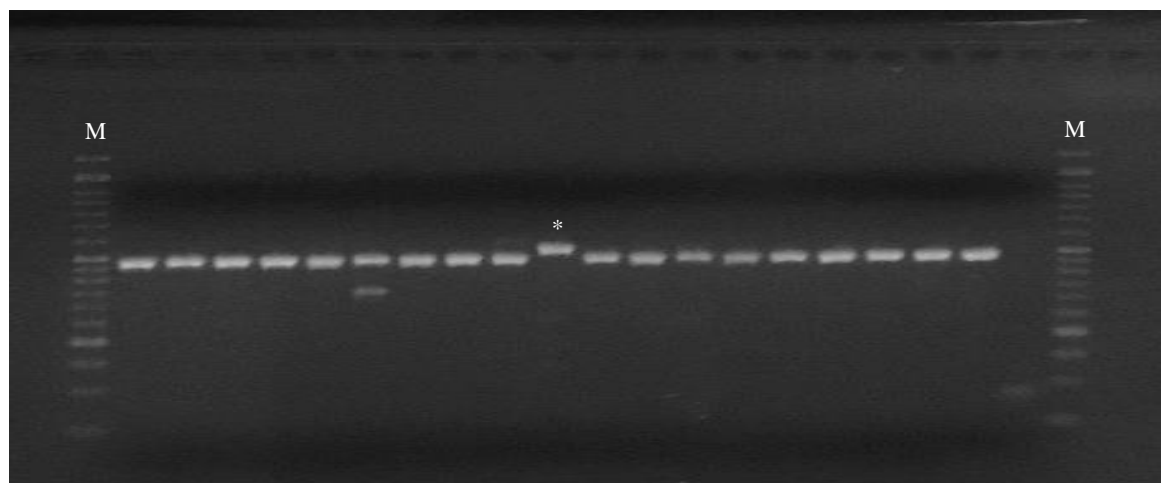


Figura 3.2 - Exemplos de amplificação positiva do *locus* ITS em 19 isolados clínicos. As faixas assinaladas com M correspondem ao marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder VI. A faixa assinalada com * corresponde a um isolado do género *Nocardia* que foi incluída erroneamente neste ensaio. A eletroforese foi realizada num gel de agarose a 1,5 % (p/v) em tampão borato de sódio 1x.

Tabela 3.4 – Identificação de isolados clínicos incluídos no estudo através da sequenciação do *locus* ITS.

Isolado	Identificação baseada na sequenciação do <i>locus</i> ITS	Cobertura (%)	Identidade (%)
MI1	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	99	99,32
MI2	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	99	98,65
MI3	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	98	99,32
MI4	<i>M. chimaera</i>	99	99,32
MI5	<i>M. chimaera</i>	97	99,52
MI6	<i>M. chimaera</i>	99	98,61
MI7	<i>M. intracellulare</i>	99	98,87
MI8	<i>M. marseillense</i>	97	99,32
MI9	<i>M. colombiense</i>	96	98,19
MI11	<i>M. avium</i>	93	99,52
MI12	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	96	99,10
MI13	<i>M. colombiense</i>	100	98,17
MI14	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	97	99,77
MI15	<i>M. chimaera</i>	94	99,31
MI16	<i>M. chimaera</i>	81	96,81
MI17	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	96	99,52
MI18	<i>M. chimaera</i>	99	99,32
MI19	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	98	99,53
MI20	<i>M. chimaera</i>	99	99,10
MI21	<i>M. chimaera</i>	98	98,87
MI22	<i>M. marseillense</i> , <i>M. intracellulare</i>	96	98,15
MI23	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	99	99,77
MI24	<i>M. chimaera</i>	99	99,55
MI25	<i>M. chimaera</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. yongonense</i> , <i>M. indicus pranii</i>	96	99,54
<i>M. avium</i> ATCC25291	<i>M. avium</i> sbsp. <i>hominissuis</i> , <i>M. avium</i> sbsp. <i>Paratuberculosis</i>	98	99,77
<i>M. avium</i> 104	<i>M. avium</i> sbsp. <i>hominissuis</i>	96	99,54

Tabela 3.4 – Continuação.

MA13	<i>M. avium</i> sbsp. <i>hominissuis</i>	99	98,64
MA21	<i>M. avium</i> sbsp. <i>hominissuis</i> , <i>M. avium</i> sbsp. <i>Paratuberculosis</i>	99	98,88
MA24	<i>M. avium</i> sbsp. <i>hominissuis</i> , <i>M. avium</i> sbsp. <i>Paratuberculosis</i>	95	99,08

Posteriormente, as sequências obtidas para o *locus* ITS foram sujeitas a um alinhamento a partir do qual foi possível contruir uma árvore filogenética (Figura 3.3). Neste alinhamento para além das sequências dos isolados já referidos, foram ainda incluídas a sequência do isolado MX e sequências de controlo para as espécies/subespécies *M. intracellulare* (NC_016946.1), *M. tuberculosis* (NC_000962.3), *M. indicus pranii* (NC_018612.1), *M. marseillense* (NZ_CP023147.1), *M. chimaera* (NZ_CP012885.2), *M. avium* subsp. *avium* (EF643010.1; EF643013.1), *M. avium* subsp. *hominissuis* (NC_008595.1) e *M. intracellulare* subsp. *yongonense* (NC_021715.1). As sequências de controlo foram todas obtidas no site do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acedido a 15 de Julho de 2019 às 15h00).

Observando a árvore filogenética (Figura 3.3), verifica-se que o isolado MX é o isolado que se encontra mais afastado de todos os isolados testados, verificando-se também uma certa concordância na posição dos isolados entre si e em relação aos controlos obtidos do NCBI. Embora a sequenciação do *locus* ITS não tenha permitido identificar com certeza os isolados MI1, MI2, MI3, MI17, MI19, MI23 e MI25 (Tabela 3.4), verifica-se na árvore filogenética (Figura 3.3) que estes isolados possuem uma maior proximidade genética com outros isolados de *M. intracellulare* e com a estirpe controlo de *M. intracellulare* (NC_016946.1) do que com os restantes isolados pelo que se pode presumir, com base na análise da árvore filogenética e dos resultados obtidos anteriormente, que estes isolados pertencem à espécie *M. intracellulare*.

Alguns isolados, no entanto, aparecem na árvore filogenética em posições pouco expetáveis, tendo em conta os resultados obtidos em testes anteriores. Um exemplo é o isolado MI11 que aparece junto aos isolados de *M. chimaera*, uma posição topologicamente incongruente com os resultados obtidos anteriormente. Enquanto o isolado MI7, classificado através da sequenciação do *locus* ITS como *M. intracellulare*, aparece, na árvore filogenética, junto ao controlo para *M. intracellulare* subsp. *yongonense* (NC_021715.1), os isolados MI14 e MI22 aparecem um pouco mais afastados em relação aos outros isolados de *M. intracellulare*, sendo que o isolado MI14 aparece junto ao controlo para *M. indicus pranii* (NC_018612.1). Os resultados mostram que *M. yongonense* e *M. indicus pranii* são de facto geneticamente muito próximos de *M. intracellulare* havendo ainda alguma controvérsia acerca da sua possível reclassificação como subespécies de *M. intracellulare* (Castejon *et al.*, 2018).

Assim, devido às suas posições na árvore filogenética e devido ao facto da sequenciação do *locus* ITS não ter permitido obter as suas identificações, foi ainda realizada a sequenciação do gene *hsp65* para os isolados MI7, MI11, MI12, MI14, MI22 (Tabela 3.5). Esta sequenciação permitiu não só confirmar que o isolado MI7 (identificado como *M. intracellulare* através da sequenciação do *locus* ITS) pertence de facto à espécie *M. intracellulare*, como confirmar a identificação dos isolados MI12, MI14, e MI22 enquanto *M. intracellulare*. A sequenciação do gene *hsp65* não permitiu, no entanto, esclarecer em definitivo a espécie à qual pertence o isolado MI11 uma vez que este permanece classificado como *M. avium*, uma classificação oposta à sugerida pela sua posição na árvore filogenética e pela amplificação dos quatro *loci* (IS901, IS1311, IS1245 e DT1) realizada no início deste trabalho. A sequenciação destes dois *loci* mostrou-se bastante útil na identificação dos isolados não permitindo, no entanto, a sua identificação ao nível da subespécie.

Tabela 3.5 - Identificação dos isolados clínicos incluídos no estudo através da sequenciação do gene *hsp65*.

Isolado	Identificação baseada na sequenciação do <i>hsp65</i>	Cobertura (%)	Identidade (%)
MI7	<i>M. intracellulare</i>	99	99,00
MI11	<i>M. avium</i>	99	99,00
MI12	<i>M. intracellulare</i>	98	99,26
MI14	<i>M. intracellulare</i>	99	99,25
MI22	<i>M. intracellulare</i>	100	98,06

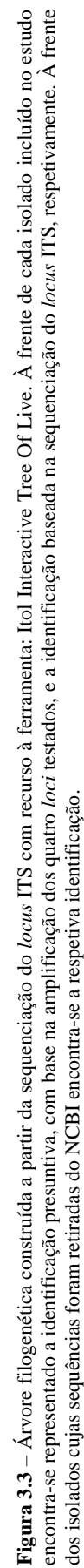
Assim, por observação da posição dos isolados na árvore filogenética (Figura 3.3) e usando todos os resultados obtidos, é possível presumir a identificação, ao nível da espécie, de todos os isolados com exceção do isolado MI11 (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Identificação presuntiva dos 46 isolados clínicos.

Isolado	Identificação Reportada	Identificação Presuntiva
<i>M. avium</i> ATCC25291	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
<i>M. avium</i> 104	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA3	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA4	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA5	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA6	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA7	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA8	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA9	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA10	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA11	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA12	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA13	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
MA14	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA15	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA16	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA17	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
MA18	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA19	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA20	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA21	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
MA22	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA23	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MA24	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
MI1	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI2	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI3	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI4	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI5	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI6	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI7	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI8	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. marseillense</i>
MI9	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. colombiense</i>
MI11	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. avium/intracellulare</i>

Tabela 3.6 – Continuação.

MI12	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI13	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. colombiense</i>
MI14	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI15	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI16	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI17	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI18	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI19	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI20	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI21	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI22	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI23	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
MI24	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
MI25	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>



3.5 – Níveis de resistência aos antibióticos

Com o objetivo de caracterizar os níveis de resistência aos antibióticos utilizados no tratamento de diversas micobacterioses e a sua distribuição epidemiológica, foi determinada a CMI por microdiluição em placa para seis antibióticos em todos os isolados clínicos estudados e nas estirpes de referência *M. avium* ATCC25291 e 104. Foram ainda determinadas as concentrações necessárias para inibir o crescimento de 50 % (CMI₅₀) e 90 % (CMI₉₀) dos isolados (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015).

Para a claritromicina os dois isolados resistentes apresentaram uma CMI de 32 µg/mL, não se tendo verificado nenhum isolado com uma CMI de 64 µg/mL. A CMI₅₀ e a CMI₉₀ foram de 4 µg/mL e 16 µg/mL, respetivamente (Figura 3.4A). Para a rifabutina a distribuição da CMI dos isolados resistentes foi de 0,5 a 4 µg/mL com uma CMI₅₀ de 0,5 µg/mL e uma CMI₉₀ de 2 µg/mL (Figura 3.4B). Para o etambutol e amicacina, a distribuição da CMI foi de 2 a 32 µg/mL e de 2 a 64 µg/mL, respetivamente. A distribuição da CMI dos isolados resistentes para o etambutol variou de 8 a 32 µg/mL enquanto para a amicacina, os dois isolados resistentes apresentaram uma CMI de 64 µg/mL. Enquanto a CMI₅₀ foi 8 µg/mL para os dois antibióticos, a CMI₉₀ foi de 16 µg/mL para o etambutol e 32 µg/mL para a amicacina (Figura 3.4C e Figura 3.4F, respetivamente). A rifampicina foi o antibiótico que apresentou a maior distribuição de CMI com isolados a crescerem em todas as concentrações testadas. Assim, a distribuição da CMI para a rifampicina foi de ≤0,125 a ≥32 µg/mL tendo a CMI₅₀ e a CMI₉₀ sido igual a 4 µg/mL e a 16 µg/mL, respetivamente (Figura 3.4E). Por fim, a moxifloxacina apresentou uma CMI₅₀ igual a 1 µg/mL e uma CMI₉₀ igual 4 µg/mL tendo a distribuição da CMI variado de 0,25 a ≥32 µg/mL. A distribuição da CMI dos isolados resistentes variou de 4 a ≥32 µg/mL (Figura 3.4D).

Verificou-se que muitos isolados apresentam uma CMI acima da concentração máxima (µg/mL) que o antibiótico atinge no organismo humano (C_{max}), o que sugere que em caso de infeção no Homem, estes isolados podem permanecer ativos uma vez que o antibiótico não atinge níveis séricos inibitórios (Freitas *et al.*, 2017; Roberts & Lipman, 2009). Os valores das C_{max} (µg/mL) para a claritromicina, rifabutina, etambutol, moxifloxacina, rifampicina e amicacina foram obtidos, respetivamente, de: Chu *et al.*, 1992; Burman *et al.*, 2001; Peloquin *et al.*, 1999; Siefert *et al.*, 1999; Grosset & Ji B, 1998; Amikacin, 2008.

Os resultados aqui obtidos para estirpes clínicas de MNT isoladas em Portugal são muito idênticos aos obtidos em estudos prévios (Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015). Uma exceção foi que no presente trabalho se obteve um elevado número de isolados com uma CMI para a claritromicina de 16 µg/mL. Enquanto nos trabalhos de Schön & Chryssanthou (2017) e de Wei *et al.* (2015) só uma pequena fração (2,62 % e 6 %, respetivamente) dos isolados cresceu a concentrações superiores a 8 µg/mL, no presente estudo a percentagem homóloga foi de 29,2 %.

A rifabutina foi o antibiótico com a distribuição de CMI mais distinta, sendo que a maioria dos isolados apresentou uma CMI ≥ 0,5 µg/mL contrariamente ao que foi observado em alguns estudos prévios (Schön & Chryssanthou, 2017; Litvinov *et al.*, 2018) em que a maioria dos isolados deixou de crescer em concentrações superiores a 0,25 µg/mL. A moxifloxacina também apresentou resultados um pouco diferentes em relação aos obtidos por Schön & Chryssanthou (2017), mas bastante semelhantes aos obtidos por Wei *et al.* (2015), uma vez que neste estudo, assim como nos trabalhos de Wei *et al.* (2015), a maior parte dos isolados apresentou uma CMI de 1 µg/mL enquanto nos trabalhos Schön & Chryssanthou (2017) a maior parte dos isolados apresentou uma CMI de 2 ou 4 µg/mL.

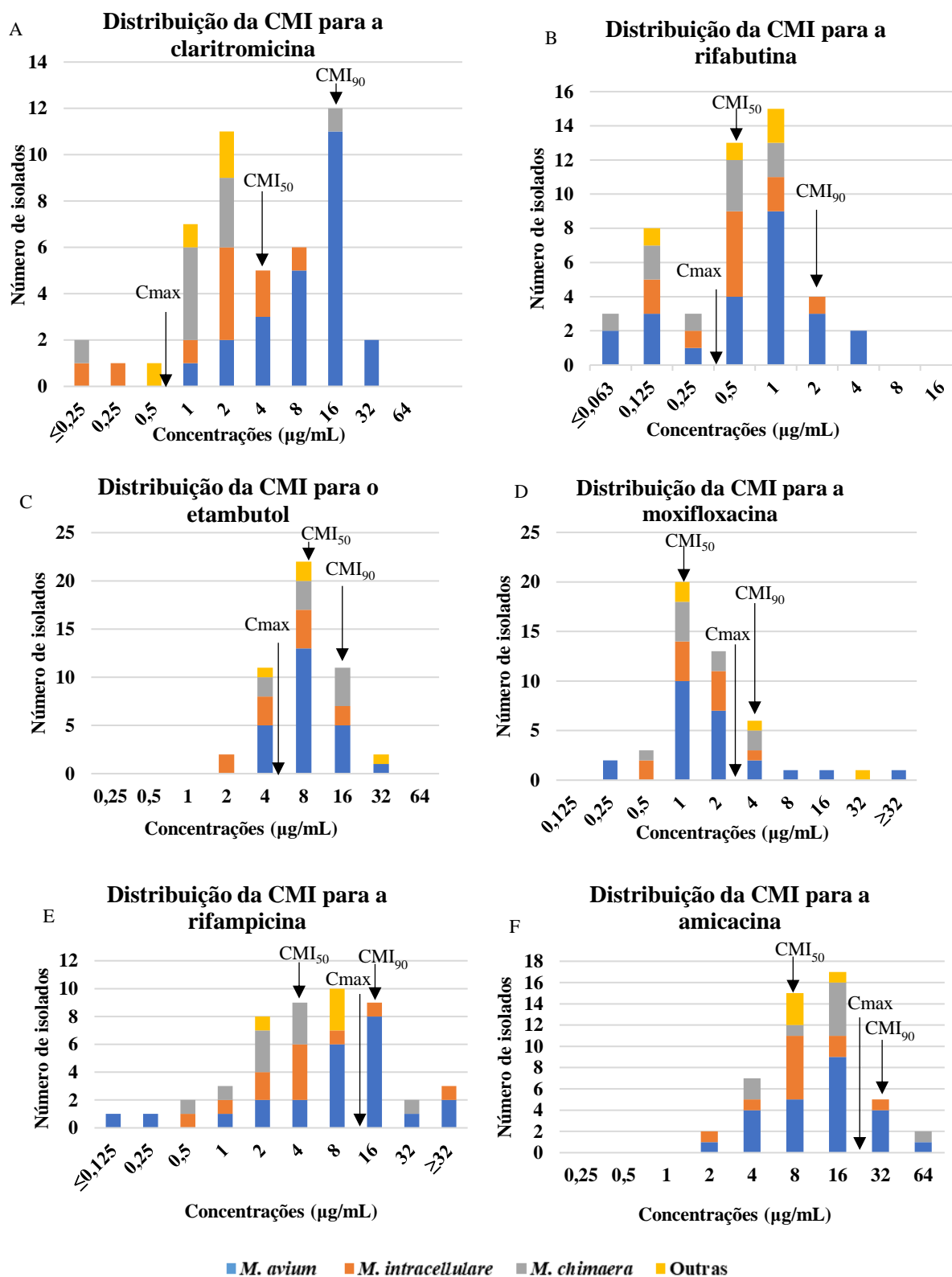


Figura 3.4 – Distribuição da CMI, CMI₅₀, CMI₉₀ e Cmax dos fármacos usados contra MAC: (A) claritromicina (CLA); (B) rifabutina (RIB); (C) etambutol (EMB); (D) moxifloxacina (MXF); (E) rifampicina (RIF); (F) amicacina (AMK). Outras corresponde aos isolados: MI8, MI9, MI11 e MI13. A Cmax para A, B, C, D, E e F corresponde aos valores: 0,6 µg/mL; 0,375 µg/mL; 5 µg/mL; 3,1 µg/mL; 14,91 µg/mL e 26 µg/mL, respetivamente.

Relativamente às resistências, a claritromicina e a amicacina foram os antibióticos com a menor percentagem de isolados resistentes, tendo-se observado uma percentagem de isolados sensíveis de 70,83 % e 85,42 %, respetivamente. A rifabutina e o etambutol foram os antibióticos que apresentaram a maior percentagem de isolados resistentes (70,83 %) com o etambutol a ter a menor percentagem de isolados sensíveis (4,2 %). Nos testes para a rifampicina observou-se que 50 % dos isolados eram resistentes a este antibiótico e que, assim como para o etambutol, a percentagem de isolados sensíveis foi bastante baixa (8,33 %). Por fim, para a moxifloxacina verificou-se que 52,1 % dos isolados eram sensíveis e que 20,83 % eram resistentes (Figura 3.5 e Tabela 3.7).

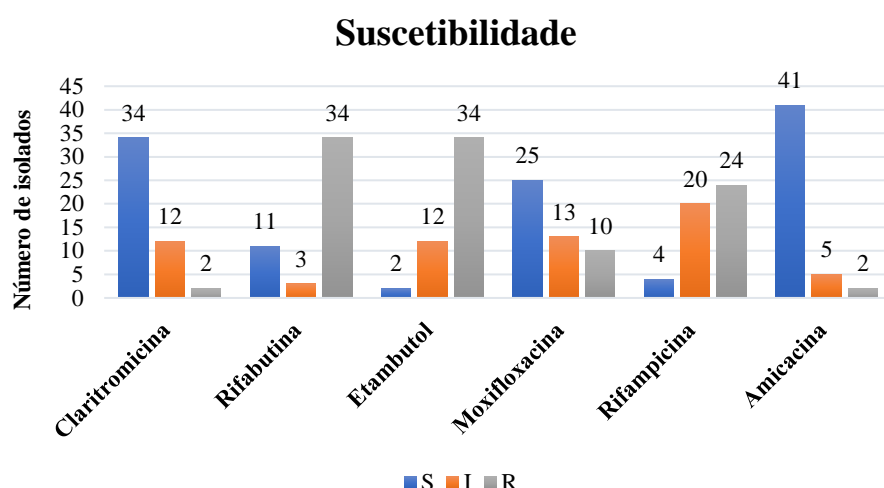


Figura 3.5 – Distribuição do isolados de acordo com a respetiva suscetibilidade aos antibióticos: S – sensível; I – intermediário; R - resistente.

Assim como os resultados obtidos na distribuição da CMI para os antibióticos testados, os resultados obtidos referentes à resistência/suscetibilidade dos isolados também foram bastante consistentes com os verificados na literatura. Embora a percentagem de isolados resistentes e sensíveis varie de estudo para estudo, a claritromicina é o antibiótico que costuma apresentar a menor percentagem de isolados resistentes (Jeon *et al.*, 2014; Kontos *et al.*, 2015; Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015) enquanto o etambutol é o antibiótico que costuma apresentar maior percentagem de isolados resistentes (Kontos *et al.*, 2015; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015). Resultados um pouco diferentes foram obtidos no estudo de Mok *et al* (2019), com isolados de *M. chimaera*, em que apenas 11 % dos isolados apresentaram resistência ao etambutol. A amicacina, assim como a claritromicina, é outro antibiótico que também costuma apresentar uma percentagem de isolados resistentes bastante baixa (Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015), sendo que neste estudo a percentagem de isolados resistentes para este antibiótico foi igual à obtida para a claritromicina. A rifabutina foi o antibiótico com resultados mais contrastantes com os da literatura (Schön & Chryssanthou, 2017) uma vez que se verificou uma percentagem de isolados resistentes mais elevada do que o esperado. Os resultados obtidos para a rifampicina e moxifloxacina são relativamente idênticos aos observados na literatura (Kontos *et al.*, 2015; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015) com exceção do estudo de Mok *et al* (2019) em que, quando comparados com este trabalho, a moxifloxacina apresentou uma maior percentagem de isolados resistentes e a rifampicina apresentou uma menor percentagem de isolados resistentes.

As diferenças obtidas entre este trabalho e os estudos referidos anteriormente podem ser explicadas pelo facto das distribuições das CMIs das estirpes selvagens não estarem bem descritas e dos pontos de corte não estarem bem estabelecidos para microrganismos MAC (Schön & Chryssanthou, 2017). Além disso,

enquanto no presente trabalho a leitura das CMI's foi realizada através de observação em um microscópio óptico invertido, noutros estudos recorreram à observação a olho nu ou através de sistemas automáticos de aquisição de imagem (Schön & Chrysanthou, 2017).

Tabela 3.7 – Suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos incluídos no estudo. S – sensível; I – intermediário; R - resistente.

Isolados	Identificação Presuntiva	CLA	RIB	EMB	MXF	RIF	AMK
<i>M. avium</i> ATCC25291	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	S	R	R	R	R	S
<i>M. avium</i> 104	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	R	R	S	R	S
MA3	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	S	R	S	I	S
MA4	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	R	R	S	R	S
MA5	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	R	R	R	I	R	S
MA6	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	S	R	S
MA7	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	R	R	S
MA8	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	I	R	S
MA9	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	S	I	S	S	S
MA10	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	R	I	S	R	S
MA11	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	S	R	S
MA12	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	I	R	R	S
MA13	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	S	S	R	I	I	S
MA14	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	S	R	S
MA15	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	R	R	R	S	R	I
MA16	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	I	R	S
MA17	<i>M. avium</i>	S	I	I	S	I	S
MA18	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	R	R	S	R	S
MA19	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	S	I	I
MA20	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	R	R	S
MA21	<i>M. avium</i>	S	S	R	I	S	I
MA22	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	I	R	S
MA23	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	S	S	I	R	I	R
MA24	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	I	R	R	I	R	I
MI1	<i>M. intracellulare</i>	S	I	I	S	R	S
MI2	<i>M. intracellulare</i>	S	R	S	I	I	S
MI3	<i>M. intracellulare</i>	S	R	R	S	I	S
MI4	<i>M. chimaera</i>	S	R	R	S	I	S
MI5	<i>M. chimaera</i>	S	I	R	I	I	S
MI6	<i>M. chimaera</i>	I	R	R	R	R	R
MI7	<i>M. intracellulare</i>	S	S	I	S	I	S
MI8	<i>M. marseillense</i>	S	R	I	S	R	S
MI9	<i>M. colombiense</i>	S	S	I	S	R	S
MI11	<i>M. avium/intracellulare</i>	S	R	R	R	I	S
MI12	<i>M. intracellulare</i>	S	R	S	S	I	S
MI13	<i>M. colombiense</i>	S	R	R	R	R	S
MI14	<i>M. intracellulare</i>	S	R	R	R	R	I
MI15	<i>M. chimaera</i>	S	R	R	S	I	S
MI16	<i>M. chimaera</i>	S	R	R	S	I	S
MI17	<i>M. intracellulare</i>	S	R	R	R	I	S
MI18	<i>M. chimaera</i>	S	S	R	S	I	S
MI19	<i>M. intracellulare</i>	S	S	R	S	I	S
MI20	<i>M. chimaera</i>	S	R	R	I	I	S
MI21	<i>M. chimaera</i>	S	S	R	S	S	S
MI22	<i>M. intracellulare</i>	S	R	I	I	R	S
MI23	<i>M. intracellulare</i>	S	S	I	S	S	S
MI24	<i>M. chimaera</i>	S	R	R	I	I	S
MI25	<i>M. intracellulare</i>	S	R	I	I	I	S

Os resultados obtidos não permitem concluir com certeza se as resistências aos fármacos estão mais associadas a determinadas espécies, uma vez que amostra de estudo não é homogênea, ou seja, o número de espécies estudadas não é igual (24 isolados de *M. avium*, 11 isolados de *M. intracellulare*, nove isolados de *M. chimaera*, um isolado de *M. marseillense*, dois isolados de *M. colombiense* e um isolado com identificação inconclusiva). Além disso, muitos estudos não fazem a distinção entre as espécies *M. avium* e *M. intracellulare* o que dificulta a análise de resultados (Auster *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017). Contudo, apesar desta limitação, os resultados obtidos para este estudo e contexto geográfico, não sugerem a existência de associação entre o nível de resistência e espécie.

Atualmente, no tratamento de infecções por MNT, as diretrizes da ATS recomendam a administração combinada de três antibióticos, sendo normalmente um macrolídeo (claritromicina) administrado em conjunto com outros fármacos como rifamicinas, etambutol e estreptomicina ou amicacina (Kwon *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2014). Os resultados deste estudo mostram que alguns dos antibióticos frequentemente usados no tratamento micobacterioses causadas por MNT poderão não ser os mais adequados, uma vez que se verificou uma elevada percentagem de isolados resistentes a alguns dos antibióticos testados, nomeadamente ao etambutol e à rifabutina. O etambutol, clinicamente bastante utilizado, tem vindo a apresentar, nos testes de suscetibilidade, uma elevada percentagem de isolados resistentes, sendo assim importante estudar fármacos alternativos que possam substituir o etambutol no tratamento de micobacterioses causadas por MNT (Kontos *et al.*, 2015; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015). A moxifloxacina, embora tenha apresentado neste trabalho uma percentagem de isolados resistentes de 20,83 %, poderá ser usada como alternativa ao etambutol, uma vez que se tem verificado a eficácia deste fármaco no tratamento murganhos infetados com MAC (Koh *et al.*, 2013) e na inativação de isolados *M. abscessus* provenientes de amostras de expectoração de doentes infetados (Park *et al.*, 2008). Contudo, e apesar dos resultados positivos, verificou-se também que a administração de moxifloxacina pode aumentar o risco de as micobactérias adquirirem resistências, pelo que a administração deste fármaco deve ser ponderada (Koh *et al.*, 2013). A claritromicina, principal antibiótico usado no tratamento destas infecções, e a amicacina, nos testes de suscetibilidade, costumam apresentar uma baixa percentagem de isolados resistentes pelo que devem continuar a ser recomendados no tratamento destas infecções.

Este estudo sugere portanto que a claritromicina e amicacina devem ser os principais antibióticos usados no tratamento de micobacterioses causadas por MNT (Kontos *et al.*, 2015; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015) e, que sendo a moxifloxacina uma opção com resultados bastantes promissores, mais estudos devem ser feitos para avaliar o impacto que a administração deste fármaco tem na aquisição de resistências (Koh *et al.*, 2013).

3.6 – Diversidade genotípica de *M. avium*: tipificação por MIRU-VNTR

Com vista a caracterizar a estrutura populacional e clonalidade de *M. avium* procurou-se numa primeira fase proceder à genotipagem dos isolados clínicos de *M. avium* incluídos neste estudo, através da caracterização alélica de oito *loci* de MIRU-VNTR (Eisenberg *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007). O isolado MA24 não foi incluído neste estudo por ausência de crescimento. Os *loci* a caracterizar foram amplificados com sucesso para a maioria dos isolados com exceção do VNTR 3 que não amplificou em dois isolados e do VNTR 10 que não amplificou em nenhum isolado. Assim sendo, o *locus* VNTR 10 foi excluído do estudo e, portanto, para a análise de resultados apenas foram considerados sete *loci* de MIRU-VNTR com unidades de repetição variáveis entre 18-58 pb. Os tamanhos dos amplicões obtidos corresponderam, aproximadamente, a múltiplos do número de repetições e os produtos de PCR obtidos variaram entre

141 e 466 pb (Tabela 3.8). Tal como em estudos prévios (Eisenberg *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007), para todos os isolados, foi utilizada uma nomenclatura numérica sequencial para a identificação de cada de alelo (Tabela 2.4 do capítulo 2) com base no número de repetições em cada *locus*. No total, entre os 23 isolados analisados (21 isolados clínicos e as estirpes de referência *M. avium* ATCC25291 e 104) foram identificados 15 perfis *MIRU-VNTR* (Tabela 3.8). Os perfis *MIRU-VNTR* obtidos para os isolados das estirpes *M. avium* ATCC25291 e 104 foram validados por comparação com os perfis existentes na base de dados INMV (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/index.php>, acessado a 5 de setembro de 2019 às 17h15).

Tabela 3.8 – Genotipagem dos isolados clínicos de *M. avium* através da caracterização alélica de sete *loci* de *MIRU-VNTR* previamente descritos por Thibault *et al* (2007).

Isolado clínico	MIRU 292 (54 pb)		MIRU X3 (53 pb)		VNTR 25 (58 pb)		VNTR 47 (35 pb)		VNTR 3 (27 pb)		VNTR 7 (22 pb)		VNTR 32 (18 pb)	
	Alelo	pb	Alelo	pb	Alelo	pb	Alelo	pb	Alelo	pb	Alelo	pb	Alelo	pb
<i>M. avium</i> ATCC25291	2	247	3	253	1	234	3	217	1	181	1	181	7	280
<i>M. avium</i> 104	2	247	5	359	2	466	2	287	1	181	1	181	9	316
MA3	0	141	5	359	3	350	3	217	1	181	1	181	8	298
MA4	3	300	3	253	3	350	3	217	1	181	1	181	8	298
MA5	2	247	2	200	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA6	2	247	1	147	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA7	2	247	3	253	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA8	2	247	5	359	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA9	2	247	2	200	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA10	2	247	2	200	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA11	2	247	3	253	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA12	3	300	2	200	3	350	3	217	1	181	1	181	8	298
MA13	0	141	4	306	3	350	3	217	1	181	1	181	8	298
MA14	2	247	5	359	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA15	2	47	2	200	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA16	2	247	2	200	3	350	3	217	1	181	1	181	8	298
MA17	1	194	1	147	4	408	8	392	1	181	1	181	7	280
MA18	2	247	3	253	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA19	2	247	2	200	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA20	2	247	3	253	2	292	2	182	5	289	1	181	8	298
MA21	0	141	2	200	3	350	3	217	NA*	NA*	1	181	8	298
MA22	2	247	3	253	2	292	2	182	1	181	1	181	8	298
MA23	2	247	3	253	2	292	2	182	NA*	NA*	1	181	9	316

*NA – não amplificou

Relativamente à diversidade alélica (h) por *locus*: i) os *loci* VNTR 3 e 32 foram os mais homogêneos, com a maioria dos isolados a apresentar uma e oito unidades de repetição, respetivamente; ii) o *locus* VNTR 7 apresentou uma distribuição nula com todos os isolados a apresentarem uma unidade de repetição; e, iii) o *locus* MIRU X3 apresentou o maior poder discriminatório uma vez que apresentou cinco alelos com uma a cinco repetições dependendo do isolado. Estes resultados (Tabela 3.9) são concordantes com os obtidos em estudos previamente reportados (Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007), uma vez que nesses estudos o *locus* MIRU X3 também apresentou a maior diversidade alélica em oposição aos *loci* VNTR 3 e 7, que apresentaram a menor diversidade alélica. De fato, o baixo poder discriminatório dos *loci* VNTR 3 e 7 era expectável uma vez que na literatura se verifica que estes *loci* apresentam frequentemente uma diversidade alélica bastante reduzida ou mesmo nula (Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007; Tirkkonen *et al.*, 2010).

Tabela 3.9 – Distribuição alélica entre os isolados de *M. avium* determinada por tipagem *MIRU-VNTR*.

<i>Locus</i>	Número de isolados com um número de cópias TR específico											h
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	NA*	
292	3	1	17	2	0	0	0	0	0	0	0	0,45
X3	0	2	8	8	1	4	0	0	0	0	0	0,75
25	0	1	15	6	1	0	0	0	0	0	0	0,53
47	0	0	15	7	0	0	0	0	1	0	0	0,50
3	0	20	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0,10
7	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
32	0	0	0	0	0	0	0	2	19	2	0	0,30

*NA - não amplificou

De forma a visualizar a estrutura populacional de *M. avium* na amostra estudada, construiu-se um dendrograma UPGMA (Figura 3.6), tendo-se verificado a existência de três *clusters* com cinco, quatro e dois isolados, respetivamente. O isolado MA17 é o isolado que possui o perfil *MIRU-VNTR* mais diferenciado divergindo por isso a partir de um nodo localizado mais profundamente no dendrograma. A estirpe *M. avium* ATCC25291 também apresentou um perfil bastante diferenciado quando comparado com os restantes isolados. De fato, a distância desta estirpe em relação aos outros isolados era expectável uma vez que *M. avium* ATCC25291 foi usado como controlo positivo para a subespécie *M. avium* subsp. *avium* e, no presente trabalho, se verificou que todos os isolados de *M. avium*, com exceção dos isolados MA13 (também identificado como *M. avium* subsp. *avium*), MA17 e MA21 (cuja identificação ao nível da subespécie foi inconclusiva), pertencem à subespécie *M. avium* subsp. *hominissuis*. A estirpe *M. avium* 104 (controlo positivo para *M. avium* subsp. *hominissuis*) apresentou um perfil único não aparecendo por isso em nenhum *cluster*.

O poder discriminatório deste método foi consideravelmente elevado, tendo o índice discriminatório (DI) sido igual a 0,93. Como não foi amplificado o *locus* VNTR 10, este método na sua configuração original poderia apresentar um poder discriminatório superior uma vez que incluiria mais um *locus*. No entanto, alguns estudos (Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007) demonstraram que o *locus* VNTR 10 não tem um poder discriminatório muito elevado, sendo apresentado em todos estes estudos (Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007) um poder discriminatório inferior ao dos *loci* MIRU 292, MIRU X3, VNTR 25, VNTR 47 e VNTR 32. Assim, pode-se presumir que mesmo que o *locus* VNTR 10 tivesse sido amplificado com sucesso, o poder discriminatório do método iria ser aproximadamente igual ao obtido. Verifica-se pelos resultados obtidos que a tipagem por *MIRU-VNTR* foi suficiente para comparar e diferenciar grande parte dos isolados sendo, no entanto, necessário a combinação com outros métodos para se obter um maior poder discriminatório (Radomski *et al.*, 2010).

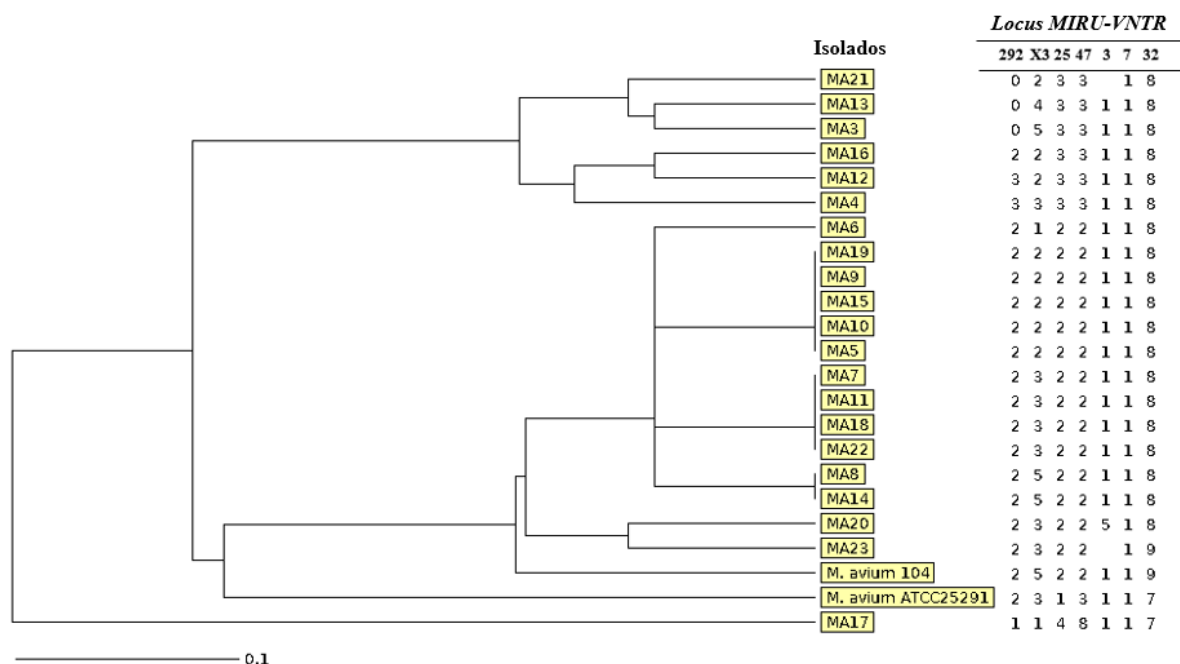


Figura 3.6 - Dendrograma construído, com o método UPGMA, com base no perfil *MIRU-VNTR* através da adaptação dos dados obtidos pela ferramenta *MIRU-VNTRplus* (Weniger *et al.*, 2010), para os isolados clínicos de *M. avium*. O perfil INMV não foi verificado devido à ausência do locus VNTR 10 no estudo.

3.7 - Diversidade genotípica de *M. avium*: tipificação por *MATR-VNTR*

Não tendo os sete *loci* de *MIRU-VNTR* demonstrado um poder discriminatório suficiente para distinguir todos os isolados clínicos de *M. avium*, seguidamente recorreu-se à caracterização alélica de 12 *loci* *MATR-VNTR* nos quais as unidades de repetição variaram entre 52 e 59 pb (Tabela 2.6 do capítulo 2) (Inagaki *et al.*, 2009). Os 12 *loci* foram amplificados com sucesso para a maioria dos isolados e a variabilidade dos tamanhos dos amplicões obtidos correspondeu, conforme esperado, a múltiplos do número de repetições. Os produtos de PCR obtidos variaram entre 163 e 563 pb (Figura 3.7), tendo-se obtido um total de 18 perfis *MATR-VNTR* (Figura 3.8).

Os *loci* MATR-4 e MATR-12 foram os que apresentaram menor diversidade alélica com a maioria dos isolados a apresentarem duas e três unidades de repetição, respetivamente. Em contrapartida, os *loci* MATR-8, MATR-11 e MATR-14 foram os *loci* com a maior diversidade alélica (Tabela 3.10). Comparando estes resultados com os obtidos por Inagaki *et al* (2009) verifica-se que em ambos os casos, os *loci* MATR-4 e MATR-12 são dos *loci* que apresentam menor diversidade alélica. Contudo, no estudo de Inagaki *et al* (2009) verificou-se que o MATR-5 e o MATR-15 também apresentaram um poder discriminatório bastante baixo e que o MATR-7 foi o locus com maior poder discriminatório enquanto que, neste trabalho o locus com maior poder discriminatório foi o MATR-8. As diferenças observadas em relação aos estudos de Inagaki *et al* (2009), podem ser explicadas pela ausência de amplificação de alguns *loci* em alguns isolados o que resultou na formação de perfis incompletos.

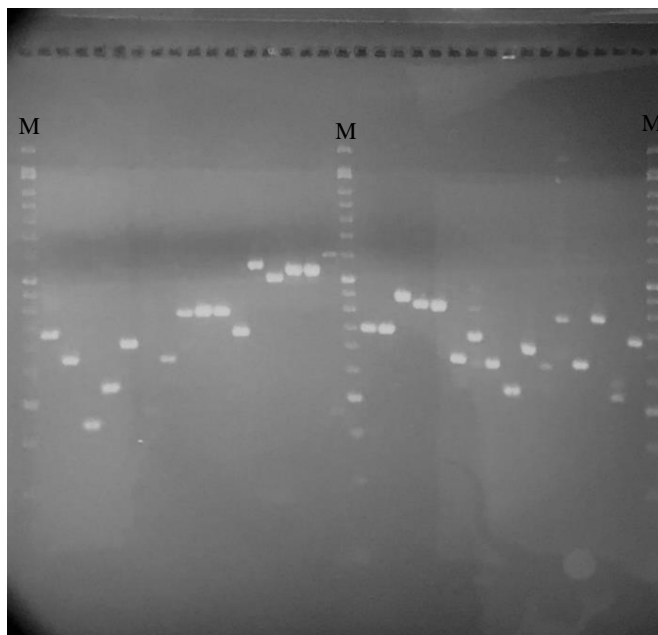


Figura 3.7 – Exemplo de 31 amplicões (representativos) associados a um determinado número de repetições em *tandem* para os 12 *loci* *MATR-VNTR*. As faixas assinaladas com a letra M correspondem ao marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder VI. A eletroforese foi realizada com um gel de agarose a 2 % (p/v) em tampão borato de sódio 1x.

Tabela 3.10 - Distribuição alélica entre os isolados de *M. avium* determinada por tipagem *MATR-VNTR*.

<i>Locus</i>	Número de isolados com um número de cópias TR específico								<i>h</i>
	0	1	2	3	4	5	6	NA*	
MATR-1	0	4	19	0	0	0	0	0	0,30
MATR-4	0	3	16	0	0	0	0	4	0,28
MATR-5	0	1	4	18	0	0	0	0	0,37
MATR-6	0	5	0	8	0	0	0	10	0,51
MATR-7	0	2	2	17	1	1	0	0	0,45
MATR-8	0	2	9	2	3	7	0	0	0,75
MATR-11	0	0	1	5	2	5	0	10	0,73
MATR-12	0	0	1	19	0	0	0	3	0,10
MATR-13	1	4	18	0	0	0	0	0	0,37
MATR-14	0	1	12	0	8	0	2	0	0,62
MATR-15	0	0	6	0	14	0	0	3	0,44
MATR-16	0	0	10	12	0	0	0	1	0,52

*NA - não amplificou

Por fim, e assim como procedido para a tipagem por *MIRU-VNTR*, construiu-se um dendrograma UPGMA (Figura 3.8) tendo-se verificado a existência de três *clusters* com dois isolados cada e um *cluster* com três isolados. Tal como na tipagem por *MIRU-VNTR*, a estirpe *M. avium* ATCC25291 também apresentou um perfil *MATR-VNTR* bastante distinto em relação aos demais isolados estando, de acordo com este método, geneticamente mais afastado dos restantes isolados. A estirpe *M. avium* 104 formou um *cluster* com o isolado MA5, o que não aconteceu na tipagem por *MIRU-VNTR* em que a estirpe *M. avium* 104 apresentou um perfil único. Destaca-se ainda que o isolado MA17 embora continue a apresentar um perfil único deixa de surgir como o isolado mais divergente.

Observando os dois dendrogramas verifica-se que, embora na tipagem por *MATR-VNTR*, o número de *clusters* tenha aumentado, o número de isolados agrupados em *cluster* diminuiu. Assim, o poder discriminatório deste método foi superior ao da tipagem por *MIRU-VNTR*, tendo-se obtido um índice discriminatório (DI) igual 0,976. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Inagaki *et al* (2009) uma vez que no seu estudo a tipagem por *MATR-VNTR* também apresentou um maior poder discriminatório que a tipagem por *MIRU-VNTR*.

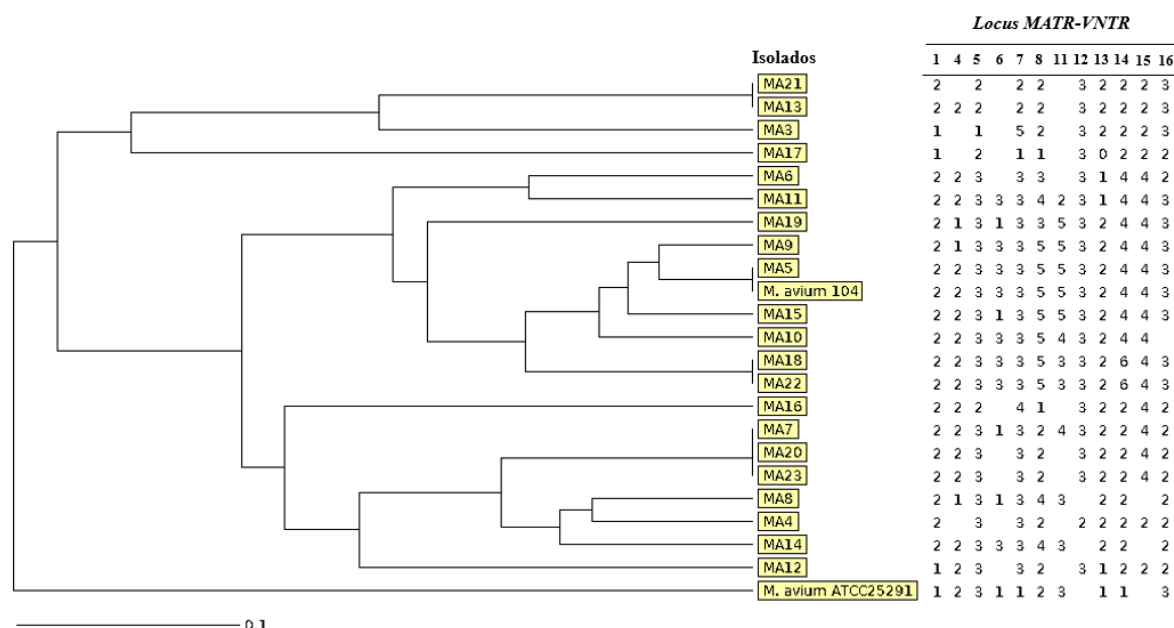


Figura 3.8 - Dendrograma construído, com o método UPGMA, com base no perfil *MATR-VNTR* através da adaptação dos dados obtidos pela ferramenta *MIRU-VNTRplus* (Weniger *et al.*, 2010), para os isolados clínicos de *M. avium*.

3.8 - Diversidade genotípica de *M. avium*: abordagem combinada com *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR*

No presente estudo, tanto a tipagem por *MIRU-VNTR* como a tipagem por *MATR-VNTR* apresentaram um poder discriminatório relativamente elevado sendo os valores dos seus índices discriminatórios (DI) bastante próximos de 1 (0,930 e 0,976 respetivamente). Contudo, para se obter um poder discriminatório ainda maior e conseguir diferenciar o maior número possível de isolados os dois métodos foram combinados (Inagaki *et al.*, 2009; Thibault *et al.*, 2007). Assim, foi construído um dendrograma UPGMA tendo em conta o perfil *MIRU-VNTR* e o perfil *MATR-VNTR* para cada isolado. Ao dendrograma foram ainda adicionados os resultados da amplificação dos quatro *loci* testados no início deste trabalho (IS901, IS1245, IS1311 e DT1) e os perfis de suscetibilidade aos seis antibióticos testados (Figura 3.9).

Verificou-se apenas a existência de um *cluster* com dois isolados, o MA18 e o MA22, ambos provenientes da mesma unidade hospitalar. Estes dois isolados apenas diferiram na suscetibilidade à claritromicina e à moxifloxacina uma vez que o MA18 é sensível para estes antibióticos e o MA22 apresenta suscetibilidade intermédia. O isolado MA17 é o isolado que possui os perfis *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR* mais diferenciados sendo também o isolado com um perfil de sensibilidade aos antibióticos único. Além disso, dos quatro *loci* testados, apenas amplificou a IS901 e a IS1311, algo não verificado em mais nenhum isolado. Assim, e tal como verificado na tipagem por *MIRU-VNTR*, o isolado MA17 é o mais distinto em relação aos restantes, surgindo como o isolado mais divergente.

No dendrograma, é ainda possível verificar que para além do isolado MA17, a estirpe *M. avium* ATCC25291 também apresenta perfis bastante diferenciados quando comparada com os restantes isolados, sendo também a única em que se verificou a amplificação dos quatro *loci* (IS901, IS1245, IS1311 e DT1). Assim, com exceção do isolado MA17, a estirpe *M. avium* ATCC25291 é a que se encontra geneticamente mais afastado dos restantes isolados.

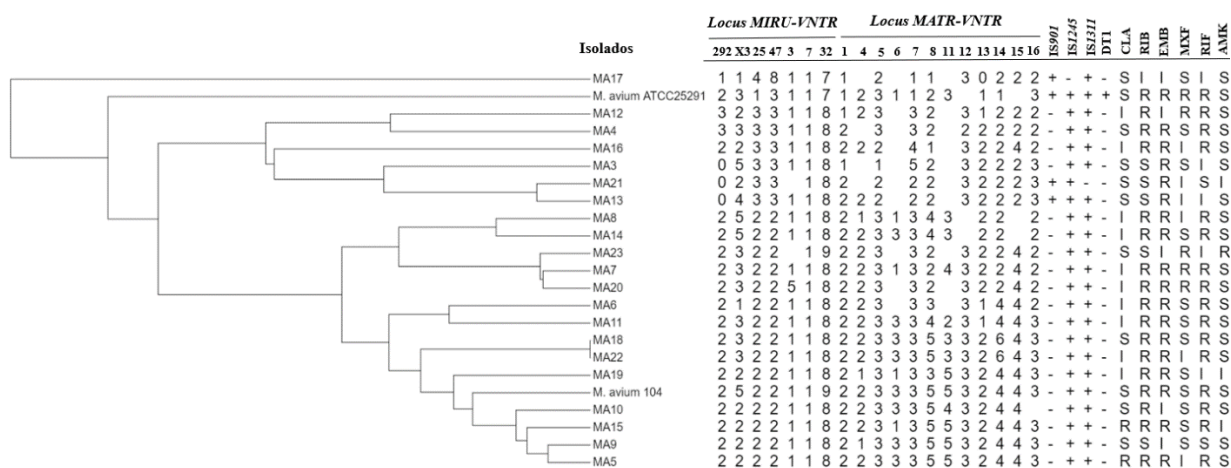


Figura 3.9 - Dendrograma construído, com o método UPGMA, com base nos perfis *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR* através da adaptação dos dados obtidos para a ferramenta *MIRU-VNTRplus* (Weniger *et al.*, 2010), para isolados clínicos de *M. avium*. Os resultados referentes à amplificação dos quatro *loci* testados (IS901, IS1245, IS1311 e DT1) e aos testes de suscetibilidade aos antibióticos encontram-se representados à frente de cada isolado.

Verifica-se então que a combinação destes dois métodos permitiu aumentar ainda mais o poder discriminatório obtendo-se um valor de DI igual a 0,996. Obtiveram-se 22 perfis *VNTR* distintos sendo que, dos 23 isolados, apenas dois apresentaram o mesmo perfil (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 – Índices discriminatórios da tipagem por *MIRU-VNTR* e por *MATR-VNTR* nos isolados clínicos de *M. avium*.

Método de tipagem	Número de perfis	Número de clusters	Número de isolados em clusters	Número de isolados únicos	HGDI*
<i>MIRU-VNTR</i>	15	3	11	12	0,930
<i>MATR-VNTR</i>	18	4	9	14	0,976
<i>MIRU-VNTR</i> + <i>MATR-VNTR</i>	22	1	2	21	0,996

*calculado como descrito por Hunter PR & Gaston MA (1988).

Os resultados mostram que a amostra de estudo é bastante diversa e possui uma baixa clonalidade uma vez que só dois isolados permaneceram em *cluster*. A diversidade da amostra ocorreu tanto a nível genotípico como a nível fenotípico com os isolados a apresentarem diferentes perfis de suscetibilidade aos antibióticos. A diversidade comumente apresentada por MNT, juntamente com o facto de se tratarem de microrganismos de distribuição ubíqua, levanta vários problemas para a saúde pública sugerindo várias vias de infeção tornando-se difícil perceber se os isolados possuem uma origem comum e, portanto, de que maneira se encontram relacionados (Ahlstrom *et al.*, 2015; Iakhiaeva *et al.*, 2013; Le Dantec *et al.*, 2002). Além disso, as infeções por MNT não são de notificação obrigatória, o que torna difícil perceber de que forma estas micobactérias se distribuem globalmente (Cassidy *et al.*, 2009; Hoefsloot *et al.*, 2013).

A abordagem combinada de *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR* resultou num poder discriminatório demasiado elevado que, do ponto de vista clínico e epidemiológico, nem sempre é satisfatório uma vez que se pode atingir um ponto de saturação em que já não se consegue diferenciar mais os isolados podendo também a elevada discriminação dos isolados sugerir erroneamente vias de transmissão e fontes de infeção distintas (Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Thibault *et al.*, 2007). Assim, deve-se ter em conta que uma discriminação, por análise de sequências *VNTR*, demasiado elevada pode resultar em conclusões erradas, sendo fundamental perceber até que ponto se deve discriminar (Ahlstrom *et al.*, 2015).

De forma geral, o poder discriminatório dos *loci* frequentemente utilizados na caracterização genotípica dos isolados não varia muito de estudo para estudo (Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007). Assim, do ponto de vista prático e para experiências futuras, pode ser interessante perceber quais *loci* devem ou não integrar o estudo, ou seja, até que ponto a inclusão de novos *loci* é vantajoso e melhora o poder discriminatório do método. No presente trabalho, os *loci* MIRU X3, MATR-8 e MATR-11 foram os *loci* que mais contribuíram para a discriminação de isolados, sendo que houve *loci* com um poder discriminatório muito reduzido. Se o dendrograma tivesse sido contruído apenas com os resultados obtidos para estes três *loci*, ter-se-ia obtido um índice de diversidade igual a 0,953 e um total de 13 isolados distribuídos em cinco *clusters*. Nesta situação hipotética, o poder discriminatório seria mais elevado do que o obtido na tipagem por *MIRU-VNTR* com o uso de sete *loci*. Seguindo este raciocínio, se o *locus* MATR-14 (quarto *locus* com maior poder discriminatório) fosse também adicionado ao estudo os resultados não seriam alterados continuando-se a ter um índice de diversidade igual a 0,953 e um total de 13 isolados distribuídos em cinco *clusters*. Contudo, se invés do *locus* MATR-14 se inclui-se o *locus* VNTR 3 (que possui um poder discriminatório bastante baixo), obter-se-ia um índice de diversidade igual a 0,964 e um total de 12 isolados distribuídos em cinco *clusters*, verificando-se assim um aumento do poder discriminatório. Verifica-se assim que utilizando um conjunto reduzido que integre os *loci* MIRU X3, VNTR 3, MATR-8 e MATR-11 seria possível obter um poder discriminatório bastante elevado nesta população de estudo.

Por fim, importa realçar que embora sejam várias as vantagens da tipagem por *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR* (fácil execução, requer uma baixa quantidade de DNA, não é ambígua e é facilmente adaptável para a genotipagem de várias estirpes de micobactérias (Dauchy *et al.*, 2010)), estas apenas permitam a análise de menos de 1 % do genoma pelo que a sua validade em esclarecer fontes de infeção e a diversidade populacional ainda tem que ser determinada (Ahlstrom *et al.*, 2015). O caminho futuro, e já bastante utilizado atualmente, é a sequenciação completa do genoma (*WGS*) que possibilita ultrapassar muitas das limitações destes métodos, sendo por isso bastante útil em estudos epidemiológicos e na abordagem a muitas questões microbiológicas, como evolução, surtos, resistência a antibióticos e patogenicidade (Ahlstrom *et al.*, 2015; Iakhiaeva *et al.*, 2013; Uchiya *et al.*, 2017).

4.1 - Conclusões

Embora o conhecimento sobre as MNT tenha aumentado nos últimos anos, bastante permanece por elucidar acerca da sua diversidade genética, facto que é incontornável dada a sua importância na identificação laboratorial no laboratório de micobacteriologia (Akram & Attia, 2018). É ainda da maior relevância o reconhecimento da diversidade genética destas espécies ao nível da saúde pública, na identificação das suas dinâmicas de transmissão e, identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de micobacterioses por MNT (Iakhiaeva *et al.*, 2013). O objetivo deste trabalho consistiu na comparação e diferenciação de um conjunto de isolados clínicos através de tipificação genética e fenotípica.

Inicialmente, recorreu-se à amplificação dos *loci* IS901, IS1311, DT1 (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010) e IS1245 (Álvarez *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2006) para confirmar a identificação laboratorial dos isolados de *M. intracellulare* e para tentar identificar os isolados de *M. avium* ao nível da subespécie. O método mostrou-se eficaz na diferenciação de espécies tendo sido, no entanto, necessários outros métodos para conseguir identificar todos os isolados, dado que isolados pertencentes a espécies que não possuem os *loci* testados não puderam ser identificadas mediante este método (Tabela 3.2). Uma possível maneira de resolver este problema seria, para além de usar um maior número de *loci*, usar também *loci* específicos de outras espécies MAC. Assim, procedeu-se à amplificação do gene SR1 (específico de *M. chimaera*) que permitiu identificar nove isolados de *M. chimaera*, previamente identificados como *M. intracellulare* (Tabela 3.3) (Zozaya-valdés *et al.*, 2017), sendo a diferenciação destas duas espécies de extrema importância uma vez que se tem verificado um aumento das infeções provocadas por *M. chimaera* em ambiente hospitalar (Becker *et al.*, 2019).

Posteriormente, para tentar confirmar a identificação de todos os isolados de *M. intracellulare* e dos isolados de *M. avium* com perfil genotípico incongruente, procedeu-se à sequenciação do *locus* ITS e do gene *hsp65*, este apenas para cinco isolados (MI7, MI11, MI12, MI14 e MI22) (Lecorche *et al.*, 2018). Os resultados obtidos não se mostraram por si só suficientes para identificar todos os isolados de *M. intracellulare* uma vez que o método atribuiu a vários isolados o mesmo grau de identidade para várias espécies (Tabela 3.4 e 3.5). Contudo, a combinação destes métodos permitiu presumir a identificação de todos os isolados, com exceção do isolado MI11 que apresentou resultados bastante contraditórios uma vez que, enquanto a amplificação dos *loci* IS901, IS1245, IS1311 e DT1 sugerem que este isolado pertence à espécie *M. intracellulare*, a sequenciação dos *loci* ITS e *hsp65* classificam este isolado como *M. avium*. Também não foi possível identificar ao nível da subespécie os isolados MA17 e MA21. Os resultados mostraram ainda, que entre os 24 isolados clínicos inicialmente identificados como *M. intracellulare*, um pertence à espécie *M. marseillense*, dois pertencem à espécie *M. colombiense* e nove pertencem à espécie *M. chimaera* (Tabela 3.6).

Na tipagem fenotípica dos isolados efetuou-se testes de suscetibilidade a seis antibióticos (Jeon *et al.*, 2014; Kontos *et al.*, 2015; Mok *et al.*, 2019; Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015) tendo-se verificado que a maioria dos isolados é sensível para a claritromicina e amicacina e resistente para o etambutol e rifabutina. A rifampicina e a moxifloxacina foram os antibióticos que apresentaram um maior número de isolados com suscetibilidade intermédia (Figura 3.5). Relativamente à distribuição das CMIs para os seis antibióticos, e assim como os resultados descritos anteriormente, verificou-se uma certa concordância com os resultados obtidos em estudos prévios (Schön & Chryssanthou, 2017; Wei *et al.*, 2015) tendo a rifabutina sido o antibiótico que apresentou valores mais distintos (Figura 3.4B). Assim, os resultados deste estudo mostram que alguns dos antibióticos frequentemente usados no tratamento de micobacterioses causadas por MNT poderão não ser os mais adequados, uma vez que se

verificou uma elevada percentagem de isolados resistentes a alguns dos antibióticos testados, nomeadamente ao etambutol e à rifabutina.

A tipagem genotípica dos isolados de *M. avium* foi realizada por comparação dos seus perfis *MIRU-VNTR* (Eisenberg *et al.*, 2012; Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007) e *MATR-VNTR* (Inagaki *et al.*, 2009). Todos os *loci* foram amplificados com sucesso para a maioria dos isolados com exceção do *locus* VNTR 10 que, por essa razão, foi excluído do estudo. Verificou-se que, enquanto na tipagem por *MIRU-VNTR* os *loci* VNTR 3 e 7 foram os que apresentaram menor diversidade alélica, com a maioria dos isolados a apresentar uma unidade de repetição, o *locus* MIRU X3 foi o que apresentou maior diversidade alélica, tendo sido o *locus* que mais contribuiu na discriminação de isolados (Tabela 3.9). Na tipagem por *MATR-VNTR*, os *loci* MATR-4 e MATR-12 foram os que apresentaram menor diversidade alélica e os *loci* MATR-8, MATR-11 e MATR-14 foram os que apresentaram maior diversidade alélica tendo apresentado um poder discriminatório semelhante ao do *locus* MIRU X3 (Tabela 3.10). Ambos os métodos apresentaram um elevado poder discriminatório tendo, no entanto, o maior poder discriminatório sido alcançado quando os dois métodos foram combinados sendo que, apenas dois isolados (MA18 e MA22) não puderam ser diferenciados (Tabela 3.11), o que sugere que a amostra de estudo apresenta uma estrutura populacional bastante diversa e baixa clonalidade.

Verifica-se então que, embora existam vários métodos que permitem a caracterização genética de MNT, a tipagem por *MIRU-VNTR* e por *MATR-VNTR* são claramente dois métodos a considerar visto que apresentam um poder discriminatório bastante semelhante ou superior ao obtido pelo *RFLP* (método de referência) e são relativamente rápidos e baratos de ser efetuados (Dauchy *et al.*, 2010; Inagaki *et al.*, 2009; Rindi *et al.*, 2018).

4.2 - Perspetivas futuras

Atualmente, existe uma enorme necessidade de identificar corretamente as MNT uma vez que a capacidade de comparar diferentes estirpes destes microrganismos poderá permitir o entendimento de fontes de doenças, surtos clínicos, recorrências da doença e dinâmica populacional (Iakhiaeva *et al.*, 2013). Os estudos epidemiológicos, acompanhados de uma correta identificação e caracterização dos isolados, devem ser a primeira abordagem a considerar uma vez que é bastante importante perceber de que forma as MNT se encontram distribuídas globalmente (Hoefsloot *et al.*, 2013). Contudo, a fiabilidade destes estudos poderá depender da imposição de obrigatoriedade da notificação da doença e vigilância laboratorial, pois só assim poderá ser possível obter dados de prevalência e incidência mais precisos (Cassidy *et al.*, 2009).

Ao nível da identificação, sugere-se a procura no genoma de *loci* específicos que permitam, obter de forma rápida e precisa a identificação dos isolados. Um bom exemplo é amplificação, no presente trabalho, do gene SR1 que se mostrou fundamental na discriminação de isolados de *M. chimaera* de *M. intracellulare* (Zozaya-valdés *et al.*, 2017).

A caracterização da diversidade genética e da estrutura populacional dos isolados clínicos de *M. avium* é, frequentemente, realizada com recurso a *VNTRs*, sendo que a análise de sequências de *MIRU-VNTR* e *MATR-VNTR* tem-se mostrado bastante eficiente para este fim. Contudo, estes métodos de tipagem são limitados pelo número de *loci* VNTR e pelo seu poder discriminatório (Inagaki *et al.*, 2009; Pate *et al.*, 2011; Radomski *et al.*, 2010; Rindi *et al.*, 2013; Thibault *et al.*, 2007). Assim, para aumentar o poder discriminatório destes métodos sugere-se a investigação de novos *loci* conservados e específicos que possam ser usadas para comparar e diferenciar isolados. Futuramente, e sempre que possível, sugere-se

ainda recorrer à sequenciação completa do genoma (*WGS*) uma vez que este método permite ultrapassar várias limitações impostas pelos métodos atualmente mais utilizados (Ahlstrom *et al.*, 2015).

Relativamente à caracterização fenotípica, e em particular aos níveis de resistência, o presente estudo realça a necessidade de investigação de novos fármacos com eficácia para as MNT uma vez que existe já alguma resistência por parte das MNT a alguns dos antibióticos frequentemente utilizados a nível terapêutico. Destaca-se ainda a importância de investigar e descrever as distribuições das CMI's para estirpes selvagens bem como estabelecer os pontos de corte para microrganismos MAC (Schön & Chryssanthou, 2017), uma vez que não existe uma uniformidade nos valores usados o que origina resultados discordantes entre os diversos estudos.

Referências Bibliográficas

- Adachi, T., Ichikawa, K., Inagaki, T., Moriyama, M., Nakagawa, T., Ogawa, K., Hasegawa, Y., & Yagi, T. (2016). Molecular typing and genetic characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from humans and swine in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 65: 1289-1295
- Ahlstrom, C., Barkema, H. W., Stevenson, K., Zadoks, R. N., Biek, R., Kao, R., Trewby, H., Hauptstein, Deb., Kelton, David F., Fecteau, Gilles., Labrecque, Olivia., Keefe, Greg., McKenna, S., & De Buck, J. (2015). Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on a national and herd level. *BMC Genomics*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1387-6>
- Akram, S, M., & Attia, F, N. (2018). *Mycobacterium Avium Intracellulare*. *StatPearls*.
- Alffenaar, J. W. C., & van Ingen, J. (2017). Treatment of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex: A great leap forward. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, ii1-ii2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx310>
- Álvarez, J., García, I. G., Aranaz, A., Bezos, J., Romero, B., De Juan, L., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., & Domínguez, L. (2008). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: Molecular characterization for diagnostic purposes. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1246–1251. <https://doi.org/10.1128/JCM.01621-07>
- Amikacin. (2008). *Tuberculosis*, 88(2), 87–88. doi:10.1016/s1472-9792(08)70003-9
- Amonsin, A., Li, L. L., Zhang, Q., Bannantine, J. P., Motiwala, A. S., Sreevatsan, S., & Kapur, V. (2004). Multilocus Short Sequence Repeat Sequencing Approach for Differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1694–1702. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1694-1702.2004>
- Ashworth Dirac, M., Weigel, K. M., Yakrus, M. A., Becker, A. L., Chen, H. L., Fridley, G., Sikora, A., Speake, C., Hilborn, E., Pfaller, S., & Cangelosia, G. A. (2013). Shared *Mycobacterium avium* genotypes observed among unlinked clinical and environmental isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5601–5607. <https://doi.org/10.1128/AEM.01443-13>
- Aung, T. T., Yam, J. K. H., Lin, S., Salleh, S. M., Givskov, M., Liu, S., Lwin, N. C., Yang, L., & Beuerman, R. W. (2016). Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 60(1), 24–35. <https://doi.org/10.1128/AAC.01509-15>.
- Auster, L., Sutton, M., Gwin, M. C., Nitkin, C., & Bonfield, T. L. (2019). Optimization of In Vitro *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* Growth Assays for Therapeutic Development. *Microorganisms*, 7(2), 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020042>
- Bartos, M., Hlozek, P., Svastova, P., Dvorska, L., Bull, T., Matlova, L., Parmova, I., Kuhn, I., Stubbs, J., Moravkova, M., Kintr, J., Beran, V., Melicharek, I., Ocepek, M., & Pavlik, I. (2006). Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 333–345. doi:10.1016/j.mimet.2005.05.009
- Becker, S., Schlotthauer, U., Schäfers, H.-J., Bals, R., & Trudzinski, F. (2019). Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie von Infektionen durch *Mycobacterium chimaera*.

- Biet, F., Sevilla, I. A., Cochard, T., Lefrançois, L. H., Garrido, J. M., Heron, I., Juste, R. A., McLuckie, J., Thibault, V. C., Supply, P., Collins, D. M., Behr, M. A., & Stevenson, K. (2012). Inter- and Intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.41.2718>
- Bland, C. S., Ireland, J. M., Lozano, E., Alvarez, M. E., & Primm, T. P. (2005). Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5719–5727. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5719-5727.2005>
- Bodle, E. E., Cunningham, J. A., Della-Latta, P., Schluger, N. W., & Saiman, L. (2008). Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 390–396. <https://doi.org/10.3201/eid1403.061143>
- Bodmer, T., Miltner, E., & Bermudez, L. E. (2000). *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 45–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00567-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00567-4)
- Brown-Elliott, B. A., Iakhiaeva, E., Griffith, D. E., Woods, G. L., Stout, J. E., Wolfe, C. R., Turenne, C. Y., & Wallace, R. J. (2013). In vitro activity of amikacin against isolates of *Mycobacterium avium* complex with proposed MIC breakpoints and finding of a 16S rRNA gene mutation in treated isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3389–3394. <https://doi.org/10.1128/JCM.01612-13>
- Bull, T. J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E. J., Stevenson, K., Pickup, R., & Hermon-Taylor, J. (2003). Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Molecular and Cellular Probes*, 17(4), 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00047-1)
- Burman, W. J., Gallicano, K., & Peloquin, C. (2001). Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Rifamycin Antibacterials. *Clinical Pharmacokinetics*, 40(5), 327–341. doi:10.2165/00003088-200140050-00002
- Cassidy, P. M., Hedberg, K., Saulson, A., McNelly, E., & Winthrop, K. L. (2009). Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 49(12), e124–e129. <https://doi.org/10.1086/648443>
- Castejon, M., Menéndez, M. C., Comas, I., Vicente, A., & Garcia, M. J. (2018). Whole-genome sequence analysis of the *Mycobacterium avium* complex and proposal of the transfer of *Mycobacterium yongonense* to *Mycobacterium intracellulare* subsp. *Yongonense* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1998–2005. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002767>
- Chan, E. D., & Iseman, M. D. (2013). Underlying Host Risk Factors for Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(1), 110–123. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1333573>
- Chen, K., Zhang, Y., & Peng, Y. (2017). Variable-number tandem repeat markers for *Mycobacterium intracellulare* genotyping: Comparison to the 16s rRNA gene sequencing. *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(2), 158–165. <https://doi.org/10.3855/jidc.7669>

- Chu, S. Y., Sennello, L. T., Bunnell, S. T., Varga, L. L., Wilson, D. S., & Sonders, R. C. (1992). Pharmacokinetics of clarithromycin, a new macrolide, after single ascending oral doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(11), 2447–2453. doi:10.1128/aac.36.11.2447
- Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S., & Bermudez, L. E. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and Immunity*, 65(9), 3759–3767.
- Cortés-Torres, N., González-y-Merchand, J. A., González-Bonilla, C., & García-Elorriaga, G. (2013). Molecular analysis of mycobacteria isolated in Mexican patients with different immunodeficiencies in a tertiary care hospital. *Archives of Medical Research*, 44(7), 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.09.002>
- Covert, T. C., Rodgers, M. R., Reyes, A. L., & Stelma, G. N. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2492–2496. <https://doi.org/10.1128/aem.00166-09>
- Daley, C. L. (2017). *Mycobacterium avium* Complex Disease. *Microbiology Spectrum*, 5(2). doi:10.1128/microbiolspec.tnmi7-0045-2017
- Dani, A. (2014). Colonization and infection. *Central European Journal of Urology*, 67(01). doi:10.5173/ceju.2014.01.art19
- Dauchy, F.-A., Dégrange, S., Charron, A., Dupon, M., Xin, Y., Bébéar, C., & Maugein, J. (2010). Variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium intracellulare* strains isolated in humans. *BMC Microbiology*, 10(1), 93. doi:10.1186/1471-2180-10-93
- De Groote, M. A., & Huitt, G. (2006). Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 42(12), 1756–1763. <https://doi.org/10.1086/504381>
- Douarre, P. E., Cashman, W., Buckley, J., Coffey, A., & O'Mahony, J. (2011). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using multi-locus short sequence repeat (MLSSR) and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing methods. *Veterinary Microbiology*, 149(3–4), 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.001>
- Eisenberg, T., Volmer, R., Eskens, U., Moser, I., Nesseler, A., Sauerwald, C., Seeger, H., Klewer-Fromentin, K., & Möbius, P. (2012). Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*. *Veterinary Microbiology*, 159(1–2), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.013>
- Estoup, A., Jarne, P., & Cornuet, J. M. (2002). Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11(9), 1591–1604. doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01576.x
- Falkinham, J. O. (1996). Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 177–215. Retrieved from pdf
- Falkinham, J. O. (2007). Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(PART 2), 250–254. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46935-0>
- Falkinham, J. O. (2009). Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 356–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

- Falkinham, J. O. (2011). Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 419–424. <https://doi.org/10.3201/eid1703.101510>
- Falkinham, J. O. (2015). Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine*, 36(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.003>
- Fedrizzzi, T., Meehan, C. J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., Sanctis, V., Rumpianesi, F., Pecorari, M., Jousson, O., Tortoli, E., & Segata, N. (2017). Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Scientific Reports*, 7(February), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep45258>
- Field, S. K., Fisher, D., & Cowie, R. L. (2004). *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patient without HIV infection. *Chest*, 126(2), 566–581. <https://doi.org/10.1378/chest.126.2.566>
- Forbes, B. A. (2017). Mycobacterial taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 380–383. <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-16>
- Freitas, F. M. de, Zamoner, W., Garms, D. S. de S., Oliveira, M. G. de, Balbi, A. L., & Ponce, D. (2017). The use of antimicrobials in septic patients with acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia : órgão Oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 39(3), 323–328. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170055>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Greenwell-Wild, T., Vazquez, N., Sim, D., Schito, M., Chatterjee, D., Orenstein, J. M., & Wahl, S. M. (2002). *Mycobacterium avium* Infection and Modulation of Human Macrophage Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 169(11), 6286–6297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6286>
- Griffith, D. E. (1999). Risk benefit assessment of therapies for *Mycobacterium avium* complex infections. *Drug Safety*, 21(2), 137–152. <https://doi.org/10.2165/00002018-199921020-00006>
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Lademaro, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C. F., Wallace, R. J., & Winthrop, K. (2007). An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4), 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
- Grosset, J., & Ji, B. (1998) Experimental Chemotherapy of Mycobacterial Diseases. In: Gangadharam P.R.J., Jenkins P.A. (eds) *Mycobacteria. Chapman & Hall Medical Microbiology Series*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7511-5_3
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T., & Telenti, A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), 304–307.
- Harris, N. B., Payeur, J. B., Kapur, V., & Sreevatsan, S. (2006). Short-sequence-repeat analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates collected from animals throughout the United States reveals both stability of loci and extensive

- diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2970–2973. <https://doi.org/10.1128/JCM.00584-06>
- Herz-gefäßchirurgie, K. T., & Umweltmedizin, B.-. (2019). Epidemiologie , Klinik , Diagnostik und Therapie von Infektionen durch *Mycobacterium chimaera* Epidemiology , Clinical Presentation , Diagnosis and Treatment of Infections Caused by *Mycobacterium chimaera* Einleitung Klinische Bedeutung von M . *chimaera* - N, 474–481.
- Hoefsloot, W., Van Ingen, J., Andrejak, C., Ängeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., ... Wagner, D. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*, 42(6), 1604–1613. <https://doi.org/10.1183/09031936.00149212>
- Horsburgh, C. R., & Selik, R. M. (1989). The Epidemiology of Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *American Review of Respiratory Disease*, 139(1), 4–7. doi:10.1164/ajrccm/139.1.4
- Huh, H. J., Kim, S.-Y., Shim, H. J., Kim, D. H., Yoo, I. Y., Kang, O.-K., ... Lee, N. Y. (2019). GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* and Determination of Clarithromycin and Amikacin Resistance . *Journal of Clinical Microbiology*, 57(8), 1–10. <https://doi.org/10.1128/jcm.00516-19>
- Hunter PR, & Gaston MA. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466. [https://doi.org/0095-1137/88/112465-02\\$02.00/0](https://doi.org/0095-1137/88/112465-02$02.00/0)
- Hwang, J. A., Kim, S., Jo, K. W., & Shim, T. S. (2017). Natural history of *Mycobacterium avium* complex lung disease in untreated patients with stable course. *European Respiratory Journal*, 49(3). <https://doi.org/10.1183/13993003.00537-2016>
- Iakhiaeva, E., McNulty, S., Brown Elliott, B. A., Falkinham, J. O., Williams, M. D., Vasireddy, R., Wilson, R. W., Turenne, C., & Wallace, R. J. (2013). Mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem- Repeat (MIRU-VNTR) genotyping of *Mycobacterium intracellulare* for strain comparison with establishment of a PCR-based database. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 409–416. <https://doi.org/10.1128/JCM.02443-12>
- Inagaki, T., Nishimori, K., Yagi, T., Ichikawa, K., Moriyama, M., Nakagawa, T., Shibayama, T., Uchiya, K., Nikai, T., Ogawa, K., & Ogawa, K. (2009). Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7), 2156–2164. <https://doi.org/10.1128/JCM.02373-08>
- Inderlied, C. B., Kemper, C. A., & Bermudez, L. E. M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(3), 266–310. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.3.266>
- Ishikane, M., & Tanuma, J. (2014). *Mycobacterium avium* complex enteritis in HIV-infected patient. *IDCases*, 1(2), 22–23. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2014.02.004>
- Jeon, S., Lim, N., Kwon, S., Shim, T., Park, M., Kim, B. J., & Kim, S. (2014). Molecular typing of *Mycobacterium intracellulare* using pulsed-field gel electrophoresis, variable-number tandem-repeat analysis, mycobacteria interspersed repetitive-unit-variable-number tandem repeat typing, and multilocus sequence typing: Molecular char. *Osong Public Health and Research Perspectives*,

- Jeyanathan, M., Alexander, D. C., Turenne, C. Y., Girard, C., & Behr, M. A. (2006). Evaluation of in situ methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in samples from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2942–2950. <https://doi.org/10.1128/JCM.00585-06>
- Johson, M. M., & Odell, J. A. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic disease*, 6(3): 210–220. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24
- Kalvisa, A., Tsirogiannis, C., Silamikelis, I., Skenders, G., Broka, L., Zirnitis, A., Jansone, I., & Ranka, R. (2016). MIRU-VNTR genotype diversity and indications of homoplasy in *M. avium* strains isolated from humans and slaughter pigs in Latvia. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.013>
- Kankya, C., Muwonge, A., Dønne, B., Munyeme, M., Opuda-Asibo, J., Skjerve, E., Oloya, J., Edvardsen, V., & Johansen, T. B. (2011). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: Public Health significance. *BMC Public Health*, 11(1), 320. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-320>
- Kikuchi, T., Watanabe, A., Gomi, K., Sakakibara, T., Nishimori, K., Daito, H., Fujimura, S., Tazawa, R., Inoue, A., Ebina, M., Tokue, Y., Kaku, M., & Nukiwa, T. (2009). Association between mycobacterial genotypes and disease progression in *Mycobacterium avium* pulmonary infection. *Thorax*, 64(10), 901–907. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.114603>
- Kim, S., Han, S. A., Kim, D. H., & Koh, W. (2017). Nontuberculous mycobacterial lung disease: ecology, microbiology, pathogenesis, and antibiotic resistance mechanisms. *Precision and Future Medicine*, 1(3), 99–114. <https://doi.org/10.23838/pfm.2017.00135>
- Koh, W. J., Hong, G., Kim, S. Y., Jeong, B. H., Park, H. Y., Jeon, K., Kwon, O. J., Lee, S.-H., Kim, C. K., & Shin, S. J. (2013). Treatment of refractory *Mycobacterium avium* complex lung disease with a moxifloxacin-containing regimen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2281–2285. <https://doi.org/10.1128/AAC.02281-12>
- Koh, W. J., Kwon, O. J., & Lee, K. S. (2005). Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: A Korean perspective. *Journal of Korean Medical Science*, 20(6), 913–925. <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.6.913>
- Koh, W. J. (2017). Nontuberculous Mycobacteria-Overview. *Microbiology Spectrum*, 5(1). doi:10.1128/microbiolspec.tnmi7-0024-2016
- Kohn, S., Koga, H., Kaku, M., Maesaki, S., & Hara, K. (1992). Prospective comparative study of ofloxacin or ethambutol for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Chest*, 102(6), 1815–1818. <https://doi.org/10.1378/chest.102.6.1815>
- Kolb, J., Hillemann, D., Möbius, P., Reetz, J., Lahiri, A., Lewin, A., Rüscher-Gerdes, S., & Richter, E. (2014). Genetic characterization of German *Mycobacterium avium* strains isolated from different hosts and specimens by multilocus sequence typing. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 941–948. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.06.001>
- Kwon, Y.-S., Koh, W.-J., & Daley, C. L. (2019). Treatment of *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 82(1), 15. doi:10.4046/trd.2018.0060

- Le Dantec, C., Duguet, J. P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., & Vincent, V. (2002). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5318–5325. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5318-5325.2002>
- Lecorche, E., Haenn, S., Mougari, F., Kumanski, S., Veziris, N., Benmansour, H., Raskine, L., Moulin, L., & Sougakoff, W. (2018). Comparison of methods available for identification of *Mycobacterium chimaera*. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.031>
- Lee, E. S., Yoon, T. H., Lee, M. Y., Han, S. H., & Ka, J. O. (2010). Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV. *Water Research*, 44(5), 1329–1334. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.046>
- Liu, J., Barry, C. E., Besra, G. S., & Nikaido, H. (1996). Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 29545–29551. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.29545>
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). Brock Biology of Microorganisms. 12th ed. Pearson Education Inc.
- Maesaki, S., Kohno, S., Koga, H., Miyazaki, Y., & Kaku, M. (1993). A clinical comparison between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections. *Chest*, 104(5), 1408–1411. <https://doi.org/10.1378/chest.104.5.1408>
- Meier, A., Heifets, L., Wallace, R. J., Zhang, Y., Brown, B. A., Sander, P., & Böttger, E. C. (1996). Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium*: Observation of multiple 23S rDNA mutations in a clonal population. *Journal of Infectious Diseases*, 174(2), 354–360. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.2.354>
- Meier, A., Kirschner, P., Springer, B., Steingrube, V. A., Brown, B. A., Wallace, R. J., & Bottgeri, E. C. (1994). Identification of Mutations in 23S rRNA Gene of Clarithromycin-Resistant *Mycobacterium intracellulare*, 38(2): 381. doi: 10.1128/AAC.38.2.381.
- Möbius, P., Luyven, G., Hotzel, H., & Köhler, H. (2008). High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 972–981. <https://doi.org/10.1128/JCM.01801-07>
- Mok, S., Hannan, M. M., Nölke, L., Stapleton, P., O’Sullivan, N., Murphy, P., McLaughlin, A. M., McNamara, E., Fitzgibbon, M., Rogers, T. R., & Rogers, T. R. (2019). Antimicrobial Susceptibility of Clinical and Environmental *Mycobacterium chimaera* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (July), 1–22. <https://doi.org/10.1128/aac.00755-19>
- Mokrousov, I. (2017). Revisiting the Hunter Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change. *Tuberculosis*, 104, 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.02.002>
- Morrison, D. A. (1996). Phylogenetic tree-building. *International Journal for Parasitology*, 26(6), 589–617. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)00044-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00044-6)
- Muwonge, A., Oloya, J., Kankya, C., Nielsen, S., Godfroid, J., Skjerve, E., Djønne, B., & Johansen, T. B. (2014). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated

- from humans, cattle and pigs in the Uganda cattle corridor using VNTR analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.012>
- Nagano, H., Kinjo, T., Nei, Y., Yamashiro, S., Fujita, J., & Kishaba, T. (2017). Causative species of nontuberculous mycobacterial lung disease and comparative investigation on clinical features of *Mycobacterium abscessus* complex disease: A retrospective analysis for two major hospitals in a subtropical region of Japan. *PLOS ONE*, 12(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186826>
- Nash, K. A., & Inderlied, C. B. (1995). Genetic basis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* isolated from patients with disseminated disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(12), 2625–2630. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.12.2625>
- Nishiuchi, Y., Iwamoto, T., & Maruyama, F. (2017). Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Medicine*, 4(March). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00027>
- Okuni, J. B., Dovas, C. I., Loukopoulos, P., Bouzalas, I. G., Kateete, D. P., Joloba, M. L., & Ojok, L. (2012). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from Ugandan cattle and strain differentiation using optimised DNA typing techniques. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-99>
- Park, S., Kim, S., Eun, M. P., Kim, H., O, J. K., Chang, C. L., Lew, W. J., Park, Y. K., & Koh, W. J. (2008). In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 23(1), 49–52. <https://doi.org/10.3346/jkms.2008.23.1.49>
- Pate, M., Kušar, D., Žolnir-Dovč, M., & Ocepek, M. (2011). MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* in animals and humans: Heterogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* versus homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* strains. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.001>
- Peloquin, C. A., Bulpitt, A. E., Jaresko, G. S., Jelliffe, R. W., Childs, J. M., & Nix, D. E. (1999). Pharmacokinetics of ethambutol under fasting conditions, with food, and with antacids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), 568–572.
- Prevots, D. R., & Marras, T. K. (2015). Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria a review. *Clinics in Chest Medicine*, 36(1), 13–34. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.002>
- Primm, T. P., Lucero, C. A., & Falkinham, J. O. (2004). Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17:98–106. doi: 10.1128/CMR.17.1.98-106.2004
- Radomski, N., Thibault, V. C., Karoui, C., De Cruz, K., Cochard, T., Gutiérrez, C., Supply, P., Biet, F., & Boschirolì, M. L. (2010). Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit- variable-number tandemrepeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1026–1034. <https://doi.org/10.1128/JCM.01869-09>
- Ray, C. G., & Ryan, K. J. (2011). *Sherrie Medical Microbiology*, 5th Edition. McGraw-Hill Medical
- Rindi, L., Buzzigoli, A., Medici, C., & Garzelli, C. (2013). High phylogenetic proximity of isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* over a two decades-period. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.022>

- Rindi, L., Lari, N., & Garzelli, C. (2018). Virulence of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Human Isolates in an *in vitro* Macrophage Infection Model. *International journal of Mycobacteriology*, 7:48-52. doi: 10.4103/ijmy_11_18
- Roberts, J. A., & Lipman, J. (2009). Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Critical Care Medicine*, 37(3), 840–851. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181961bff>
- Rónai, Z., Csivincsik, Á., Dán, Á., & Gyuranecz, M. (2016). Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, “*hominissuis*” and *silvaticum* strains of veterinary origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.004>
- Russo, C., Tortoli, E., & Menichella, D. (2006). Evaluation of the New GenoType *Mycobacterium* Assay for Identification of Mycobacterial Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 334–339. doi:10.1128/jcm.44.2.334-339.2006
- Sangari, F. J., Parker, A., & Bermudez, L. E. (1999). *Mycobacterium avium* interaction with macrophages and intestinal epithelial cells. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 4(6), D582-588. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417376>
- Schön, T., & Chryssanthou, E. (2017). Minimum inhibitory concentration distributions for *Mycobacterium avium* complex—towards evidence-based susceptibility breakpoints. *International Journal of Infectious Diseases*, 55, 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.12.027>
- Schulze-Robbecke, R., & Buchholtz, K. (1992). Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1869–1873.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., & Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 873–884.
- Shin, S. J., Lee, B. S., Koh, W. J., Manning, E. J. B., Anklam, K., Sreevatsan, S., Lambrecht, R. S., & Collins, M. T. (2010). Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and subspecies by use of five-target multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 4057–4062. <https://doi.org/10.1128/JCM.00904-10>
- Siefert, H. M., Domdey-Bette, A., Henninger, K., Hucke, F., Kohlsdorfer, C., & Stass, H. H. (1999). Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: A comparison in humans and other mammalian species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(SUPPL. B), 69–76. https://doi.org/10.1093/jac/43.suppl_2.69
- Srivastava, S., Deshpande, D., & Gumbo, T. (2017). Failure of the azithromycin and ethambutol combination regimen in the hollow-fibre system model of pulmonary *Mycobacterium avium* infection is due to acquired resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72, ii20-ii23. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx303>
- Steed, K. A., & Falkinham, J. O. (2006). Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4007–4011. <https://doi.org/10.1128/AEM.02573-05>
- Strahl, E. D., Gillasp, G. E., & Falkinham, J. O. (2001). Fluorescent Acid-Fast Microscopy for Measuring Phagocytosis and Their Intracellular Growth. *Society*, 67(10), 4432–4439.

<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4432>

- Sulis, G., Roggi, A., Matteelli, A., & Raviglione, M. C. (2014). *Tuberculosis: Epidemiology and control. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.070>
- Taylor, R. H., Falkinham, J. O., Norton, C. D., & LeChevallier, M. W. (2000). Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1702–1705. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1702-1705.2000>
- Thibault, V. C., Grayon, M., Boschioli, M. L., Hubbans, C., Overduin, P., Stevenson, K., Gutierrez, M. C., Supply, F., & Biet, F. (2007). New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2404–2410. <https://doi.org/10.1128/JCM.00476-07>
- Thierry, D., Vincent, V., Clement, F., & Guesdon, J. L. (1993). Isolation of specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their possible use in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1048–1054.
- Thomas, V., & McDonnell, G. (2007). Relationship between mycobacteria and amoebae: Ecological and epidemiological concerns. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02206.x>
- Tirkkonen, T., Pakarinen, J., Rintala, E., Ali-Vehmas, T., Marttila, H., Peltoniemi, O. A. T., & Mäkinen, J. (2010). Comparison of Variable-Number Tandem-Repeat Markers typing and IS1245 Restriction Fragment Length Polymorphism fingerprinting of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* from human and porcine origins. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-21>
- Tortoli, E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 727–752. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
- Turenne, C. Y., Collins, D. M., Alexander, D. C., & Behr, M. A. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2479–2487. <https://doi.org/10.1128/JB.01691-07>
- Uchiya, K. I., Tomida, S., Nakagawa, T., Asahi, S., Nikai, T., & Ogawa, K. (2017). Comparative genome analyses of *Mycobacterium avium* reveal genomic features of its subspecies and strains that cause progression of pulmonary disease. *Scientific Reports*, 7(November 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep39750>
- van Ingen, J., Boeree, M. J., Dekhuijzen, P. N. R., & van Soolingen, D. (2009). Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(10), 888–893. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03013.x>
- van Ingen, J., Egelund, E. F., Levin, A., Totten, S. E., Boeree, M. J., Mouton, J. W., Aarnoutse, R. E., Heifets, L. B., Peloquin, C. A., & Daley, C. L. (2012). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(6), 559–565.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0682OC>

- van Ingen, J., Kohl, T. A., Kranzer, K., Hasse, B., Keller, P. M., Katarzyna Szafrńska, A., ... Sax, H. (2017). Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(10), 1033–1041. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30324-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30324-9)
- van Soolingen, D., Haas, P., Kremer, K. Isolation of high molecular weight genomic DNA from Mycobacteria. In: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. (1999). *National Institute of Public Health and the Environment*. Bilthoven, Holanda, pp 20
- Vluggen, C., Soetaert, K., Duytschaever, L., Denoël, J., Fauville-Dufaux, M., Smeets, F., Bruffaerts, N., Huygen, K., Fretin, D., Rigouts, L., Saegerman, C., & Mathys, V. (2016). Genotyping and strain distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from humans and pigs in Belgium, 2011–2013. *Euro Surveill*. 21(3):pii=30111. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.3.30111>
- Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., & Harmsen, D. (2010). MIRU-VNTRplus: A web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2), 326–331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq351>
- Whiley, H., Keegan, A., Giglio, S., & Bentham, R. (2012). *Mycobacterium avium* complex - the role of potable water in disease transmission. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 223–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05298.x>
- Wickremasinghe, M., Ozerovitch, L. J., Davies, G., Wodehouse, T., Chadwick, M. V., Abdallah, S., Shah, P., & Wilson, R. (2005). Non-tuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis. *Thorax*, 60(12), 1045–1051. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.046631>
- Winthrop, K. L., Chang, E., Yamashita, S., Iademarco, M. F., & LoBue, P. A. (2009). Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor- α therapy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1556–1561. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090310>
- Winthrop, K. L., McNelley, E., Kendall, B., Marshall-Olson, A., Morris, C., Cassidy, M., Saulson, A., & Hedberg, K. (2010). Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: An emerging public health disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(7), 977–982. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0503OC>
- Wojtasik, A., Kubiak, A. B., Krzyzanowska, A., Majchrzak, M., Augustynowicz-Kopeć, E., & Parniewski, P. (2012). Comparison of the (CCG)₄-based PCR and MIRU-VNTR for molecular typing of *Mycobacterium avium* strains. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7681–7686. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1603-2>
- Xu, H. B., Jiang, R. H., & Li, L. (2014). Treatment outcomes for *Mycobacterium avium* complex: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(3), 347–358. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1962-1>
- Zamora, N., Esteban, J., Kinnari, T. J., Celdrán, A., Granizo, J. J., & Zafra, C. (2007). In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(9), 902–907. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01769.x>
- Zegri-Reiriz, I., Cobo-Marcos, M., Rodriguez-Alfonso, B., Millán, R., Dominguez, F., Forteza, A.,

- Garcia-Pavia, P., & Ramos-Martinez, A. (2018). Successful treatment of healthcare-associated *Mycobacterium chimaera* prosthetic infective endocarditis: the first Spanish case report . *European Heart Journal - Case Reports*, 2(4), 1–6. <https://doi.org/10.1093/ehjcr/yty142>
- Zozaya-Valdés, E., Porter, J. L., Coventry, J., Fyfe, J. A. M., Carter, G. P., Gonçalves da Silva, A., Schultz, M. B., Seemann, T., Johnson, P. D. R., Stewardson, A. J., Bastian, I., Roberts, S. A., Howden, B. P., Williamson, D. A., & Stinear, T. P. (2017). Target-Specific Assay for Rapid and Quantitative Detection of *Mycobacterium chimaera* DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1847–1856. doi:10.1128/jcm.00197-17

Apêndices

Soluções

Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (100 mL)

- 96 mL clorofórmio
- 4 mL álcool isoamílico
- esterilização na autoclave a 121 °C durante 15 min

SDS 10 % (500 mL)

- 50 mL de SDS
- 500 mL de água destilada
- esterilização na autoclave a 121 °C durante 15 min

Tampão TE 10X pH 8

- 100 mM de Tris/HCl, pH 8
- 10 mM EDTA
- diluição em água destilada
- esterilização na autoclave a 121 °C durante 15 min

Tampão Borato de Sódio 1M (1000 mL)

- 61,83 g de ácido bórico
- 10 g NaOH
- 1000 mL de água destilada